



Etude de la réponse lymphocytaire T dans l'allergie de l'enfant, au diagnostic et au cours de la désensibilisation

Bénédicte Michaud

► To cite this version:

Bénédicte Michaud. Etude de la réponse lymphocytaire T dans l'allergie de l'enfant, au diagnostic et au cours de la désensibilisation. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T025 . tel-00881757

HAL Id: tel-00881757

<https://theses.hal.science/tel-00881757>

Submitted on 8 Nov 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARISDESCARTES

THESE
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR

Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole Doctorale : Gc2iD

Discipline : IMMUNOLOGIE

présentée et soutenue publiquement
par

Bénédicte MICHAUD

le 25 Octobre 2013

Etude de la réponse lymphocytaire T dans l'allergie de l'enfant,
au diagnostic et au cours de la désensibilisation.

Jury :

Pr Franck Pagès.....Président
Pr Lucienne Chatenoud.....Directeur de thèse
Pr Jocelyne Just.....Directeur de thèse
Pr Pascal Demoly.....Rapporteur
Dr Valérie Verhasselt.....Rapporteur
Pr Michel Dy.....Examineur
Dr Catherine Neukirch-Stoop.....Examineur

Remerciements

Je remercie le Professeur Lucienne Chatenoud qui a su me donner l'opportunité de développer la recherche en allergologie dans son laboratoire et par la même occasion de mener à bien cette thèse.

Je remercie particulièrement le Professeur Jocelyne Just qui m'a amenée à me passionner pour l'allergologie en Pédiatrie et a su tout mettre en place dans son service clinique de l'hôpital Trousseau pour que ce projet de recherche translationnelle puisse se développer au sein du laboratoire d'immunologie de l'hôpital Necker.

Je remercie sincèrement le Pr Pascal Demoly et le Dr Valérie Verhasselt d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, le Pr Michel Dy et le Dr Catherine Neukirch-Stoop d'être examinateurs et le Dr Franck Pagès de présider ce jury de thèse.

Tous mes remerciements vont au Docteur Sophie Candon qui m'a fait découvrir tous les secrets de la recherche en immunologie humaine et a su répondre à mes interrogations quotidiennes multiples et variées sans jamais se lasser...

Je remercie tout particulièrement les techniciennes du laboratoire d'immunologie de Necker et notamment Laurence, Mimouna, Marie et Marie-Christine de m'avoir transmis tout leur savoir-faire en immunologie cellulaire chez l'humain et d'avoir réalisé beaucoup, beaucoup d'ELISpot...

Je remercie Cindy, Chantal et Isabelle, qui ont accepté de se faire prélever régulièrement pour mettre au point les ELISpot aux acariens...

Un grand merci au service clinique du centre de l'asthme et des allergies de l'hôpital Trousseau dont les médecins et les infirmières se sont tous investis pour mettre au point les protocoles cliniques, y inclure les patients, les motiver pour le suivi et les prélever bien-sûre ! Je remercie tout particulièrement le Dr Rahélé

Gouvis-Echraghi (CCA), le Dr Flore Amat (CCA) et les infirmières de consultation Aurore, Flavie, Nadine et Sylvie.

Concernant le protocole sur le diagnostic de l'allergie au lait de vache, je remercie sincèrement Joseph Aroulandom, interne de pédiatrie, qui a permis l'inclusion et le suivi des patients et m'a fourni toutes les données cliniques avec une rigueur remarquable.

Je remercie le Dr Rémy Couderc du service de biochimie de l'hôpital Trousseau pour le dosage des IgE et des IgG4, le Dr Jean-Philippe Jais du service de biostatistiques de l'hôpital Necker pour ses précieux conseils et Nour Baiz (Epidemiology of Allergic and Respiratory (EPAR) Department, UMR-S707) pour la réalisation des statistiques du protocole sur le diagnostic de l'allergie au lait de vache.

Un grand merci également au Dr Marie-Alexandra Alyanakian pour son soutien et sa bonne humeur quotidienne, à l'ensemble du laboratoire d'immunologie biologie de l'hôpital Necker et à l'unité INSERM U1013.

Je remercie le Pr Jean-François Bach de m'avoir permis de réaliser ce projet grâce au financement obtenu du European Research Council.

Enfin, je remercie mes parents proches, ceux présents et ceux qui ne le seront plus jamais.

Principales abréviations

APLV : allergie aux protéines de lait de vache

CD : cellules dendritiques

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

DID : diabète insulino-dépendant de type 1

D. pter : Dermatophagoides pteronyssinus

FoxP3 : forkhead/winged-helix Protein 3

HLA : human leucocyte antigen

IL- : interleukine

IFN γ : interféron gamma

ITA : immunothérapie spécifique d'allergène

PLV : protéines de lait de vache

SEP : sclérose en plaques

TGF- β : transforming growth factor-beta

Th : cellule(s) T helper

TLR : récepteur Toll like

Tr1 : cellule(s) T régulatrice(s) de type 1

Treg : cellule(s) T régulatrice(s)

Table des matières

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 11 |
| 1. EPIDEMIOLOGIE DES ALLERGIES ET HYPOTHESE HYGIENISTE | 11 |
| 2. HISTOIRE NATURELLE DE L'ALLERGIE : LA MARCHE ATOPIQUE | 15 |
| 3. MECANISMES DE TOLERANCE AUX ALLERGENES | 18 |
| 3.1. Tolérance immunitaire | 18 |
| 3.1.1. Tolérance centrale..... | 20 |
| 3.1.2. Tolérance périphérique | 21 |
| 3.1.3. Lymphocytes T régulateurs | 21 |
| 3.1.4. Identification des Treg chez l'homme | 25 |
| 3.1.5. Mécanismes de suppression des T effecteurs par les Treg dans l'allergie..... | 28 |
| 3.1.6. Pouvoir tolérogène des cellules dendritiques..... | 31 |
| 3.2. Mise en place de la tolérance immunitaire <i>in utero</i> et chez le nourrisson | 32 |
| 3.3. Profil de la réponse immunitaire chez le sujet allergique et chez le sujet sain | 36 |
| 3.3.1. Cellules régulatrices | 37 |
| 3.3.2. Cellules effectrices..... | 39 |
| 3.4. L'immunothérapie spécifique d'allergène | 46 |
| 4. L'ALLERGIE RESPIRATOIRE : EXEMPLE DE L'ALLERGIE AUX ACARIENS | 54 |
| 4.1. L'allergie aux acariens | 54 |
| 4.2. Physiopathologie de l'asthme allergique aux acariens | 54 |
| 4.2.1. Reconnaissance des allergènes par l'épithélium respiratoire..... | 55 |
| 4.2.2. Interactions entre les cellules épithéliales et les cellules dendritiques | 57 |
| 5. CAS PARTICULIER DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE | 59 |
| 5.1. Epidémiologie..... | 59 |
| 5.2. La tolérance orale..... | 60 |
| 5.2.1. Tolérance immunitaire et muqueuse gastro-intestinale..... | 61 |
| 5.2.2. Facteurs favorisant la sensibilisation aux aliments | 64 |
| 5.3. Diagnostic biologique de l'allergie alimentaire | 66 |
| OBJECTIF | 69 |
| RESULTATS | 70 |
| ARTICLE 1 : Quantification of circulating house dust mite-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells correlates with rhinitis severity in asthmatic children and varies with the seasons. | |
| | 70 |

| | |
|--|-----|
| ARTICLE 2 : Casein-specific IL-13 and IL-4 secreting T-cells: a reliable tool for diagnosis of cow's milk allergy. | 102 |
| ARTICLE 3 : Etude comparative de l'immunothérapie sous-cutanée et sublinguale chez l'enfant asthmatique allergique aux acariens: effet thérapeutique et mécanismes immunologiques | 136 |
| DISCUSSION | 162 |
| RÉFÉRENCES | 179 |
| Annexe 1 : 99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: Immune therapies of type 1 diabetes: new opportunities based on the hygiene hypothesis | 205 |
| Annexe 2 : Petit historique de l'allergologie..... | 223 |

Table des illustrations

| | |
|---|----|
| Figure 1. Relation inverse entre l'incidence des maladies infectieuses (A) et l'incidence des désordres immunologiques (B) entre 1950 et 2000. | 13 |
| Figure 2. Progression de la marche allergique chez un enfant atopique. | 16 |
| Figure 3. Génération des cellules T régulatrices au niveau du thymus et en périphérie. | 22 |
| Figure 4. Rôle des lymphocytes T régulateurs (Treg Foxp3 ⁺ et Tr1) dans le contrôle de la réponse allergique. | 39 |
| Figure 5. Pathophysiologie de l'inflammation allergique. | 41 |
| Figure 6. Les lymphocytes T dans l'allergie. | 42 |
| Figure 7. Propriétés phénotypiques des cellules T CD4 ⁺ mémoires humaines. | 44 |
| Figure 8. Mise en place de la tolérance périphérique au cours de l'immunothérapie spécifique d'allergène. | 47 |
| Figure 9. Sensibilisation des cellules Th2 par l'intermédiaire des voies respiratoires. | 57 |
| Figure 10. Mécanismes d'induction de la tolérance orale. | 64 |

INTRODUCTION

1. EPIDEMIOLOGIE DES ALLERGIES ET HYPOTHESE HYGIENISTE

L'augmentation de l'incidence des maladies allergiques et de l'atopie dans les pays industrialisés a débuté entre 1960 et 1970 avec une accélération plus marquée à partir des années 1980. Depuis, la prévalence de l'asthme augmente d'1% par an. Cette augmentation a été particulièrement importante durant les 10 dernières années, si bien qu'on a pu parler d'un « phénomène épidémique » (1). Une forte prévalence de l'asthme (>15%) a été notamment rapportée au Royaume-Uni, en Australie et en Amérique du Nord (2). Les études réalisées au Royaume-Uni montrent que l'asthme atopique serait responsable, pour une grande partie, de cette augmentation. L'incidence et la prévalence de l'atopie restent bien moindre dans la majeure partie (mais pas la totalité) des pays en voie de développement. L'étude Internationale Study of Asthma and Allergies (ISAAC) montre que la prévalence de l'asthme chez l'enfant varie entre 3% dans les pays en voie de développement et 20 à 40% dans les pays industrialisés. La prévalence des autres manifestations atopiques comme la dermatite atopique (DA) et la rhinite allergique varie globalement de la même façon (3,4). En particulier, la prévalence de la DA a doublé ou triplé dans les pays industrialisés au cours des 3 dernières décennies, touchant 15 à 30% des enfants et 2 à 10% des adultes. Ce trouble est souvent le prélude à une diathèse atopique qui comprend notamment l'asthme et la rhinoconjonctivite allergique (5,6). Ce phénomène s'accompagne d'un retentissement socioéconomique important aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant (7–11).

Il est particulièrement remarquable que, parallèlement, les principales maladies auto-immunes comme le diabète insulino-dépendant (DID) ou diabète de type 1, la sclérose en plaques (SEP) ou les maladies inflammatoires du tube digestif aient également augmenté de façon

importante dans les pays industrialisés. Le même terme d'«épidémie» a d'ailleurs été utilisé pour décrire l'augmentation récente du DID chez le jeune enfant comme il l'a été dans l'asthme (12). Cette augmentation a été d'autant plus importante dans les pays qui se sont rapidement développés et industrialisés au cours des 10 dernières années (13,14). Une partie de cette augmentation d'incidence des maladies allergiques et auto-immunes peut être attribuée à une amélioration du diagnostic et un accès plus facile aux structures de soins dans les pays industrialisés. Cependant cette explication ne peut rendre compte totalement de la rapide augmentation de prévalence de ces désordres immunologiques sur une période de temps si courte, d'autant plus que certaines des maladies en question dont le DID, la SEP ou encore l'asthme sévère sont, pour des raisons évidentes, de diagnostic inévitable. Les pays ayant eu l'augmentation la plus importante de prévalence des maladies allergiques et auto-immunes ont, à la même période, expérimenté une forte amélioration de leur statut socio-économique et sanitaire. Les mesures de santé publique prises dans ces pays ont été accompagnées d'une diminution des maladies infectieuses particulièrement claire pour l'hépatite A, les diarrhées de l'enfant et les maladies parasitaires comme la filariose, l'onchocercose, la schistosomiase et d'autres infections à helminthes comme le montre la figure 1 (15).

La répartition des maladies auto-immunes et allergiques suit un gradient Nord-Sud dans le monde et Ouest-Est en Europe, à quelques exceptions près, associée à une répartition en miroir des maladies infectieuses. Ce gradient ne peut pas être totalement attribué à des différences de terrain génétique. L'étude de la région de la Carélie est édifiante à ce sujet. La Carélie est une région géographique du nord de l'Europe s'étendant en partie sur la Finlande et en partie sur la Russie. Dans cette même région, l'incidence du DID est six fois plus élevée en Finlande qu'en Russie et de la même façon la prévalence de l'atopie a fortement augmenté en 10 ans en Finlande alors qu'elle ne s'est pas modifiée en Russie.

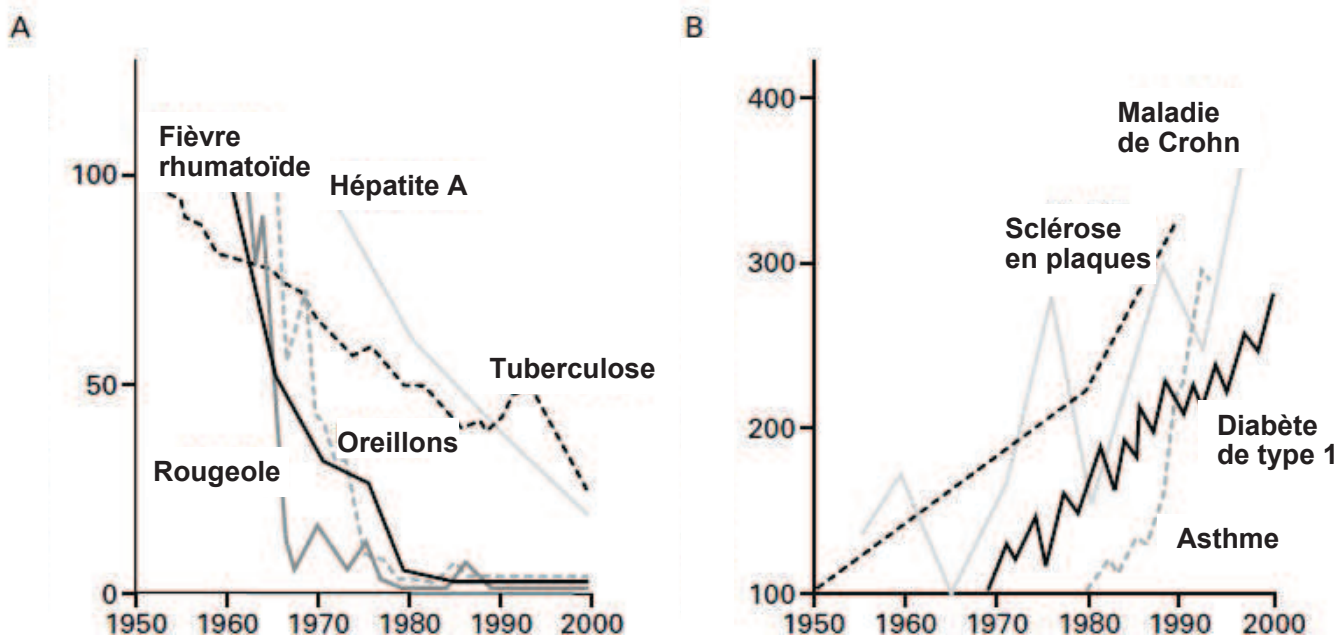


Figure 1. Relation inverse entre l'incidence des maladies infectieuses (A) et l'incidence des désordres immunologiques (B) entre 1950 et 2000. Adapté de JF Bach, NEJM, 2002

L'étude de certaines populations migrantes confirme cette observation. En particulier, de nombreuses familles pakistanaises ont migré au Royaume-Uni dans la seconde partie du XXème siècle. L'incidence du DID chez l'enfant dans ces familles était de 3.1/100,000 par an en 1978-81. Elle est passée à 11.7/100,000 par an en 1988-90 alors que celle des enfants anglais était restée stable à 10.5/100,000 par an pendant cette période. Dès la première génération, l'incidence du diabète des enfants pakistanais avait rejoint celle des enfants anglais.

Ces données n'excluent pas l'importance du terrain génétique dans le développement des maladies auto-immunes et allergiques, mais pour certains facteurs, ils ne jouent probablement qu'un rôle mineur. Ce phénomène ne peut, pas être attribué uniquement à des facteurs génétiques car le taux de mutations naturelles est très faible.

L'idée générale de l'hypothèse de l'hygiène est que certains agents infectieux sont capables de protéger vis-à-vis d'un large spectre de désordres immunologiques comme les maladies auto-immunes et les maladies allergiques.

L'hypothèse a été proposée initialement par David Strachan qui avait observé une corrélation inverse entre l'incidence du rhume des foins et l'âge des enfants dans les fratries (16). L'hypothèse a été reprise par Jean-François Bach et étendue au champs de l'auto-immunité (17). Cette hypothèse repose sur le fait que les infections comme les expositions microbiennes y compris les non-invasives peuvent influencer la réponse immune innée et adaptative de l'individu. Divers mécanismes immunologiques ont été proposés pour expliquer ce phénomène parmi lesquels on retrouve :

Le mécanisme de la compétition antigénique: la réponse immunitaire intense induite par les agents infectieux entre en compétition pour les signaux homéostatiques (qui induisent la survie et la prolifération lymphocytaire) de réponses immunitaires vis-à-vis d'antigènes plus faibles que sont les autoantigènes ou les allergènes;

Les mécanismes de l'immunorégulation : les divers types de cellules régulatrices induites par les infections peuvent, selon un effet de cible innocente ou « bystander », diminuer les réponses auto-immunes et allergiques;

Des mécanismes indépendants de l'antigène mais dépendants de récepteurs de l'immunité innée : l'activation de récepteurs de l'immunité innée, tels que les récepteurs de type toll ou TLR, semble jouer un rôle important dans l'effet protecteur des microbes vis-à-vis des maladies auto-immunes et allergiques.

2. HISTOIRE NATURELLE DE L'ALLERGIE : LA MARCHE ATOPIQUE

Le concept de marche atopique ou marche allergique a initialement été décrit par T Foucard en 1973. La notion d'atopie est une tendance personnelle ou familiale à synthétiser des immunoglobulines de type immunoglobuline E (IgE) lors de la sensibilisation à certains allergènes (18). La marche atopique, ou marche allergique, est un phénomène qui décrit la tendance d'un enfant à avoir des statuts atopiques pas seulement co-existants mais progressant de l'un à l'autre (figure 2). En général, la dermatite atopique (DA) est la première manifestation, qui débute dans les 2 à 3 premiers mois de vie. Elle est souvent associée à des sensibilisations à des aliments voire à des allergies alimentaires vraies qui s'expriment cliniquement et sont diagnostiquées au courant de la première année de vie. L'asthme apparaît à l'âge pré-scolaire et la rhinite allergique vers 6 ans (19). On peut cependant noter que la rhinite allergique a également été décrite à partir de l'âge de 18 mois (20). La description de la marche atopique s'appuie initialement sur les études épidémiologiques. La DA du nourrisson est un facteur de risque de développement de l'asthme chez l'enfant d'autant plus que l'eczéma est apparu précocement, que les lésions sont sévères, et qu'une sensibilisation allergénique est associée. De la même façon, le risque de développer une rhinite allergique est associé à la sévérité de l'eczéma et au taux d'IgE circulantes. Les raisons pour lesquelles certains patients atteints de DA évoluent vers une rhinite allergique puis un asthme (ou un asthme puis une rhinite allergique) alors que d'autres guérissent de leur atteinte cutanée, ne sont pas encore clairement élucidées. Le lien entre la rhinite allergique et l'asthme est constamment retrouvé dans les études et la rhinite allergique apparaît souvent comme un facteur de risque de développer un asthme (21,22).

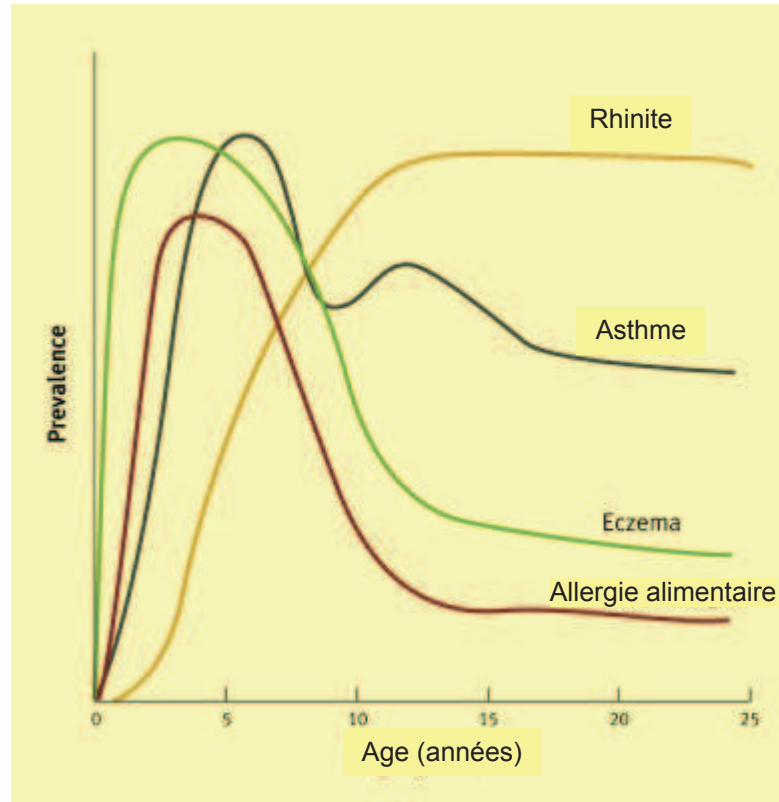


Figure 2. Progression de la marche allergique chez un enfant atopique. Adapté de Barnetson, BMJ, 2002.

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la marche atopique sont encore mal compris. Récemment, il a été décrit un défaut de perméabilité de la barrière épithéliale cutanée à l'origine de la DA. Ce défaut favoriserait la pénétration d'allergènes, de pathogènes et les agressions environnementales. Le développement d'allergies systémiques est ainsi facilité, d'autant plus qu'on observe une polarisation vers un phénotype T auxiliaire de type 2 (Th2) de la réponse lymphocytaire, producteur préférentiellement d'interleukines (IL)-4, IL-5 et IL-13. Le rôle des mutations de la filagrine, protéine de structure de l'épiderme, semble important : ces mutations prédisposent à l'asthme, à la rhinite allergique, et à l'apparition de sensibilisations allergéniques en présence de DA. L'expression du gène de la filagrine est également régulée négativement par les cytokines Th2 IL-4 et IL-13, dans la peau atteinte de

DA, ce qui signifie que l'expression de la filagrine peut être diminuée de façon innée ou acquise. Il est à noter que 40% des porteurs de mutations de la filagrine ne développent pas de DA ce qui suggère qu'il existe d'autres mécanismes impliqués dans la maladie ou d'autres protéines mutées (5). De fait, certaines protéines de structure de la barrière cutanée telles que les claudines ou les desmoglénines sont également associées à la DA (23).

3. MECANISMES DE TOLERANCE AUX ALLERGENES

La réponse immunitaire est étroitement régulée pour protéger l'hôte de stimuli extérieurs potentiellement dangereux (c'est à dire pouvant induire une réponse immune pathogène), afin d'établir un état de tolérance immunitaire. Cet équilibre peut être mis en péril par certains facteurs environnementaux et génétiques, à l'origine de maladies allergiques ou auto-immunes. Les allergènes sont présents de façon ubiquitaire dans l'environnement et la réponse immunitaire normale d'un individu sain à ces protéines solubles résulte d'un état de tolérance immunitaire (24). La sensibilisation vis-à-vis d'un antigène spécifique est un prérequis pour le développement de l'allergie chez un individu prédisposé, et dépend de son potentiel à induire une réponse Th2 au cours de laquelle l'IL-4 et l'IL-13 induisent une commutation isotypique au niveau des lymphocytes B vers la synthèse d'IgE spécifiques (25).

La tolérance immunitaire au niveau des muqueuses respiratoires vis-à-vis des antigènes environnementaux et au niveau de la muqueuse intestinale vis-à-vis des antigènes alimentaires est essentielle pour éviter le développement de réactions immunitaires à l'origine de maladies allergiques et de l'inflammation chronique qui les accompagnent. Le système immunitaire intestinal est bien connu pour sa capacité privilégiée à générer des réponses tolérogènes (26).

3.1. Tolérance immunitaire

Le phénomène de tolérance immunitaire a été initialement décrit par R. Owen en 1945 suite à ses observations séminales de mosaïsme chez des bovins jumeaux dizygotes (27).

Fait essentiel, la tolérance immunitaire n'est pas déterminée par la génétique de l'individu, elle n'est pas innée, mais s'acquière, au cours du développement embryonnaire et post-natal.

Ce sont les expériences de « tolérance néonatale » conduites dans les années 1950 par Billingham, Brent et Medawar, qui valurent le prix Nobel à ces auteurs, qui fournirent dans un modèle d'allogreffe la démonstration sans équivoque du caractère acquis de la tolérance immunitaire (28). Le modèle était simple, il s'agissait de l'administration à des souriceaux nouveau-nés de moelle osseuse et de cellules allogéniques (exprimant des antigènes d'histocompatibilité distincts de ceux de l'hôte), en l'absence de tout autre traitement immunosuppresseur. S'en suivait un état de tolérance qui se manifestait par le fait que chez les souris devenues adultes, les allogreffes de peau provenant de donneurs totalement identiques (ou histocompatibles) avec le donneur des cellules injectées à la naissance n'étaient pas rejetées et survivaient de manière indéfinie (28). En revanche, des allogreffes de peau de « tierce partie » (des souris histo-incompatibles à la fois avec les receveurs tolérants et les souris donneuses des cellules injectées à la naissance) étaient rejetées normalement ce qui confirmait que les souris ainsi traitées à la naissance n'étaient pas immunodéprimées (28).

Le concept de tolérance immunitaire a bien évidemment rapidement dépassé le cadre de la transplantation pour couvrir tous les domaines de l'immunologie dont ceux de l'auto-immunité et de l'allergie.

En auto-immunité, le concept de tolérance physiologique ou tolérance au « soi » rassemble l'ensemble des mécanismes qui permettent au système immunitaire de tout individu normal de ne pas développer de réaction agressive ou pathogène vis-à-vis des tissus de l'hôte qui l'héberge et ce, bien qu'il soit désormais clairement établi que tout sujet, indemne de pathologie auto-immune, héberge des lymphocytes autoréactifs dirigés contre divers autoantigènes. Dans le domaine de l'allergie, comme nous l'avons cité plus haut, la tolérance immunitaire à l'allergène peut être définie, du moins du point de vue opérationnel, comme le fait que l'individu ne développe pas vis-à-vis de l'allergène en question de réponse pathogène pouvant aboutir à une lésion d'organe.

Les différents mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à la tolérance immunitaire sont classiquement séparés en deux concepts distincts à savoir, la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

3.1.1. Tolérance centrale

La tolérance centrale est l'ensemble des mécanismes mis en place au niveau des organes lymphoïdes primaires, c'est-à-dire au sein de la moelle osseuse (pour les lymphocytes B) et du thymus (pour les lymphocytes T), aboutissant à l'émergence en périphérie (la circulation et les organes lymphoïdes secondaires) de lymphocytes capables de défendre l'hôte vis-à-vis des agents pathogènes tout en préservant l'intégrité des organes du « soi ». Deux phénomènes sont intimement liés : la sélection positive et la sélection négative constituent les bases moléculaires de la formation du répertoire lymphocytaire (l'ensemble des récepteurs pour l'antigène exprimés par les lymphocytes B et T d'un individu donné) (29,30).

Nous allons parler plus en détail de la sélection des lymphocytes T, qui sont des acteurs majeurs des réponses allergiques, mais le schéma général est très similaire pour les lymphocytes B.

Les progéniteurs lymphocytaires T doivent reconnaître les peptides du soi associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de l'hôte pour pouvoir passer le filtre de la sélection positive et continuer ainsi dans leur voie de différenciation. Puis, au cours de la sélection négative, les lymphocytes dont le récepteur T pour l'antigène (TCR) reconnaît les peptides du soi présentés par les molécules du CMH avec une trop forte affinité sont éliminés par délétion clonale (apoptose). Seuls les thymocytes ayant une interaction d'affinité modérée entre leur TCR et les peptides du soi associés au CMH poursuivent leur différenciation et peuvent avoir différents devenir : soit ils migrent à la périphérie en tant que cellules naïves

potentiellement effectrices, soit ils subissent une sélection agoniste et se différencient en cellules T régulatrices (29,31).

3.1.2. Tolérance périphérique

La tolérance centrale est le mécanisme principal déterminant le nombre global de cellules T dans l'organisme.

Cependant, le filtre de la sélection négative est, comme nous l'avons vu, incomplet d'où l'émergence à la périphérie de lymphocytes potentiellement autoréactifs. La tolérance périphérique a pour but de contrôler ce potentiel autoréactif dans les organes lymphoïdes périphériques, régulée par des mécanismes intrinsèques et extrinsèques. Les mécanismes intrinsèques concernent l'indifférence ou « ignorance immunitaire », l'anergie lymphocytaire et la délétion périphérique par apoptose (24). Les mécanismes extrinsèques mettent en jeu les cellules T régulatrices (Treg) et les cytokines suppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β , ainsi que les cellules dendritiques (CD).

3.1.3. Lymphocytes T régulateurs

Les Treg semblent actuellement essentiels dans la suppression de l'inflammation assurée par les lymphocytes Th2 et le maintien de la tolérance immunitaire. Les deux classes de lymphocytes CD4⁺ Treg les plus importantes sont les lymphocytes Treg naturels (nTreg) d'origine thymique et les lymphocytes Treg induits ou adaptatifs (iTreg) issus en périphérie de précurseurs T CD4⁺ conventionnels matures (32–35). Parmi les lymphocytes Treg adaptatifs ou induits on compte 3 sous-populations de lymphocytes : les iTreg Foxp3⁻ plutôt sécréteur d'IL-10 ou Treg de type 1 (Tr1), les iTreg Foxp3⁻ plutôt sécréteurs de TGF- β ou Th3, et les iTreg Foxp3⁺ (figure 3). Plusieurs particularités biologiques distinguent ces populations de Treg dont le profil de sécrétion cytokinique, les marqueurs cellulaires, la capacité à se

différencier en réponse à un stimulus spécifique d'antigène et les différents mécanismes impliqués dans leur activité immunosuppressive (34).

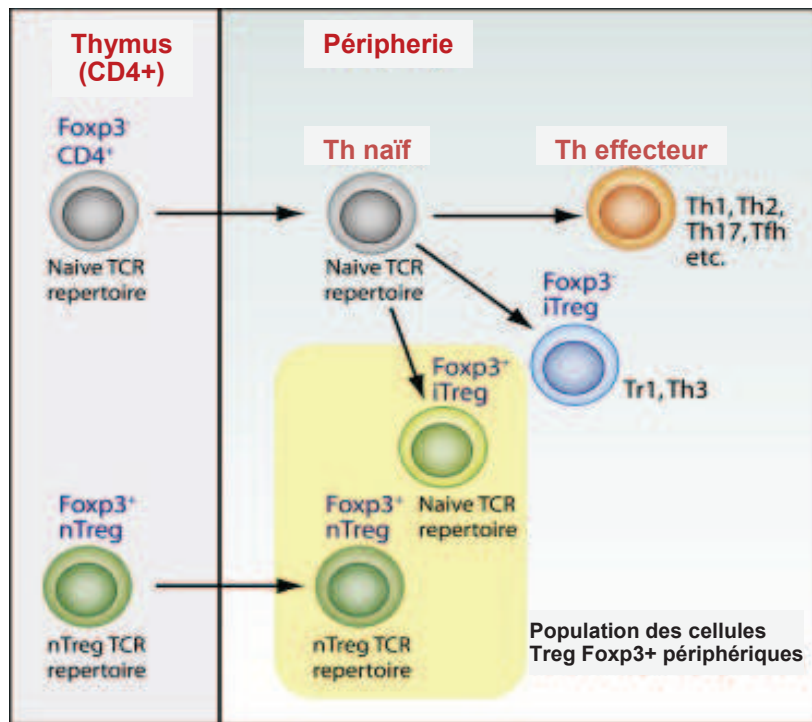


Figure 3. Génération des cellules T régulatrices au niveau du thymus et en périphérie.
Adapté de Curotto de Lafaille, Immunity, 2009

Les nTreg ont initialement été décrits en 1995 par S. Sakaguchi (36). Dans ce modèle expérimental, la reconstitution d'une souris BALB/c athymique nude (nu/nu) par des cellules lymphocytaires dépourvues de la sous-population exprimant une forte densité de la molécule CD25 (la chaîne α du récepteur de l'IL-2), lymphocytes définis comme $CD4^+CD25^{hi}$, induisaient le développement d'une polyendocrinopathie auto-immune incluant une gastrite, une thyroïdite et une orchite ou une oophorite (suivant le sexe de la souris). Puis il a été montré que la génération des nTreg avait lieu dans le thymus et qu'elle nécessitait notamment une sélection par interaction de forte affinité avec le CMH de classe II (37).

Les cellules nTreg expriment le facteur de transcription FoxP3, un des membres de la famille des facteurs de transcription forkhead winged-helix, qui est nécessaire à leur développement et à leur fonction (38,38,39). De manière intéressante, l'identification du gène *FoxP3* est intervenue de façon indépendante de l'étude des lymphocytes Treg grâce aux recherches visant à identifier le gène responsable, chez l'homme, d'une maladie rare dénommée syndrome IPEX pour *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X linked* décrite initialement en 1982. Comme son nom l'indique, ce syndrome regroupe un ensemble de manifestations auto-immunes et dysimmunitaires sévères dont une colite inflammatoire ou entéropathie et un diabète de type 1 insulino-dépendant, qui apparaissent très tôt dans la vie d'enfants de sexe masculin. Il existe également chez ces patients une augmentation des IgE et des manifestations allergiques cutanées. Malgré cette description ancienne du syndrome humain ce n'est que bien plus tard qu'il a été décrit que le syndrome IPEX résultait de mutations associées à une perte de fonction du gène *FoxP3* porté par le chromosome Y et qui sont dans leur majorité localisées dans la région forkhead qui se lie à l'ADN (40). En 2003 il fut clairement établi que l'expression de FoxP3 était un marqueur de lignée des lymphocytes Treg naturels CD4⁺CD25⁺, associé à leur fonction suppressive. En effet, si l'on transduit des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ conventionnels non régulateurs avec des retrovirus codant pour *FoxP3*, ces cellules, qui expriment le facteur de transcription en forte quantité, acquièrent des capacités régulatrices et expriment différentes molécules de surface typiques des lymphocytes régulateurs dont CD25, CTLA4 et GITR (39).

Les travaux de W. Chen ont été les premiers à montrer que des lymphocytes Treg Foxp3⁺ pouvaient également être générés en dehors du thymus (les iTreg Foxp3⁺) (33). La population périphérique de cellules Treg Foxp3⁺ comprend donc des lymphocytes nTreg et des lymphocytes iTreg. Il est très probable que, en périphérie, les nTreg et iTreg Foxp3⁺ diffèrent

dans leur répertoire de TCR, les iTreg étant à priori dérivées de cellules CD4⁺ conventionnelles périphériques.

Alors que les nTreg sont exclusivement générés au niveau du thymus, les cellules iTreg Foxp3⁺ se différencient dans des conditions plus variées, que ce soit dans la rate, les ganglions lymphoïdes, le tissu lymphoïde associé à l'intestin ou GALT, ou les tissus inflammatoires. On les retrouve par exemple dans les ganglions mésentériques au cours d'une induction de tolérance orale, et ils se différencient dans la lamina propria de l'intestin au contact du microbiote et des antigènes de l'alimentation. L'influence du microenvironnement sur le développement des iTreg Foxp3⁺ n'est pas totalement comprise. Cependant, le développement des cellules iTreg Foxp3⁺ nécessite à priori au minimum une interaction avec l'antigène, présenté par les molécules du CMH, et la présence dans l'environnement de cytokines, plus particulièrement l'IL-2 et le TGF- β (33) alors que le rôle du TGF- β dans la maturation des nTreg même s'il a été évoqué dans des expériences élégantes demeure encore débattu (34).

Il est à noter, que l'origine thymique des iTreg Foxp3⁺ a très récemment été décrite dans un modèle expérimental (41). Dans ce travail, les auteurs ont montré que des thymocytes CD4⁺CD8⁻Foxp3⁻ et des cellules récemment émigrés du thymus transférés dans une souris lymphopénique pouvaient se différencier en Treg. Par ailleurs, chez l'humain, les cellules récemment émigrés du thymus et détectés dans le sang périphériques avaient une forte capacité à acquérir le phénotype CD4⁺CD25^{hi}Foxp3^{hi}.

En ce qui concerne les iTreg chez l'homme, les études montrent que les cellules Tr1 représentent la population la plus fortement impliquée dans le contrôle de la réponse immune vis-à-vis des allergènes environnementaux (42,43).

Les cellules Tr1 ont été initialement mises en évidence dans le sang périphérique de patients atteints de déficit immunitaire combiné sévère (SCID) ayant bénéficié d'une greffe de cellules

souches hématopoïétiques HLA (pour human leucocyte antigen) non identiques (44). Les Tr1 ont une forte activité suppressive et sont décrites comme pouvant restaurer la tolérance dans de nombreuses maladies auto-immunes (45). Ces cellules sont caractérisées par leur profil de sécrétion de cytokines très particulier. Suite à leur activation par le TCR, elles produisent de grandes quantités d'IL-10, de TGF- β et d'IL-5, de faibles quantités d'IL-2 et d'IFN γ et pas d'IL-4 (46,47). L'IL-10 a un pouvoir anti-inflammatoire et immunosuppresseur sur la majorité des cellules hématopoïétiques. Elle supprime la production de cytokines et la prolifération spécifique de l'antigène des cellules CD4⁺ effectrices en inhibant la capacité de présentation de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) dont les DC, les cellules de Langerhans et les macrophages.

Les Tr1 ont une faible capacité de prolifération. Elles peuvent s'expander en présence d'IL-2 et d'IL-15 indépendamment de leur activation par le TCR. Suite à une activation par le TCR, les Tr1 expriment les marqueurs d'activation CD40L, CD69, CD28, CTLA-4 (pour Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) et HLA-DR. Elles semblent avoir une capacité sélective de migration vers les tissus inflammatoires durant une réponse immunitaire.

3.1.4. Identification des Treg chez l'homme

Depuis la description des cellules T suppressives au début des années 1970, des progrès considérables ont été réalisés dans leur caractérisation phénotypique et fonctionnelle. Initialement (en 2001), les cellules Treg humaines ont été caractérisées comme des cellules T CD4⁺CD25⁺ (48,49). En 2003, Foxp3 a été décrit comme un facteur de transcription majeur dans le développement et la fonction des Treg (38,50). Cependant, le phénotype précis, la capacité fonctionnelle et la stabilité ou la « plasticité » des cellules Treg Foxp3⁺ sont longtemps demeurés imprécis et restent complexes. Récemment, il a été montré que les cellules humaines CD4⁺Foxp3⁺ ne sont pas homogènes dans le profil d'expression de leurs

gènes, leur phénotype et leur fonction suppressive (51). Etant donnée la difficulté de la détection de la protéine intracellulaire Foxp3, certains marqueurs membranaires ont été identifiés. La molécule CD25 ne suffit pas à l'identification des Treg puisqu'elle existe également sur jusqu'à 30% des cellules T CD4⁺ du sang périphérique humain et seules 1-2% des cellules CD4⁺ (les CD25^{hi}, qui expriment fortement CD25) ont des fonctions suppressives et peuvent être considérées comme des « vrais » Treg (52). La faible expression de la molécule CD127 (chaîne α du récepteur de l'IL-7) peut être une alternative pour la purification des Treg puisque l'expression de Foxp3 est plus fréquente dans les cellules CD4⁺ exprimant faiblement CD127 (53). Cependant, les cellules T CD4⁺ conventionnelles peuvent, après activation, voir diminuer leur expression de CD127. L'expression de CD62L (L-sélectine), bien que non restreinte aux Treg, peut être utilisée pour différencier les Treg (CD25^{hi}CD127^{low}CD62L⁺) des cellules T CD4⁺ conventionnelles récemment activées, qui expriment faiblement la L-sélectine et sont CD62L^{low}. Par ailleurs, il est important de noter qu'il existe une population CD4⁺Foxp3^{low} (qui expriment faiblement Foxp3) non régulatrice. Cette population de cellules, qui expriment CD45RO, est constituée de cellules CD4⁺ effectrices activées ne présentant pas de fonction suppressive. La différence entre les cellules T Foxp3⁺ non régulatrices et les cellules T Foxp3⁺ régulatrices tient vraisemblablement à la différence de méthylation du gène Foxp3. Celui-ci est totalement déméthylé au sein de la population CD4⁺CD45RO⁻foxp3⁺ et incomplètement déméthylé dans la population CD4⁺CD45RO⁺foxp3^{low}. Ainsi, l'utilisation unique du marqueur Foxp3 n'est pas envisageable pour identifier de manière fiable la population des Treg chez l'homme. L'expression de CD45RA et CD45RO, mutuellement exclusive au sein des cellules T Foxp3⁺, est particulièrement utile et illustre l'hétérogénéité des cellules Treg. D'après les travaux récents du groupe de S. Sakaguchi chez l'humain, les cellules Treg CD45RA⁺Foxp3^{low} sont définies « naïves » et expriment faiblement Foxp3. Elles n'ont pas expérimenté de maturation

liée à une stimulation par le TCR. La majeure partie des cellules Treg dérivées du thymus et retrouvées en périphérie sont des cellules Treg naïves $CD45RA^{+}Foxp3^{low}$. Ces cellules sont dans un état quiescent. Les cellules Treg $CD45RO^{+}Foxp3^{hi}$, qui dérivent majoritairement des cellules Treg naïves $CD45RA^{+}Foxp3^{low}$, sont définies « effectrices ». *In vitro*, les cellules Treg $CD45RA^{+}Foxp3^{low}$ prolifèrent plus que les cellules Treg $CD45RO^{+}Foxp3^{hi}$ suite à une stimulation du TCR. Ces dernières ont pour leur part une activité suppressive et une forte susceptibilité à l'apoptose. Elles expriment CD25, GITR, CD95 et CTLA4 comme toute cellule récemment activée. Parmi ces cellules, les Treg effectrices $ICOS^{+}$ et $ICOS^{-}$ produisent respectivement les cytokines suppressives IL-10 et TGF- β . Par ailleurs, l'expression de HLA-DR semble identifier une sous-population de cellules Treg effectrices arrivées à un stade de différenciation terminale (51,54). Enfin, l'expression spécifique du marqueur du récepteur membranaire GARP (pour « glycoprotein-A repetitions predominant ») a également été proposée pour identifier les Treg $Foxp3^{+}$ activées mais les études chez l'homme ne sont pas nombreuses (55,56).

Chez l'homme, l'identification des iTreg $Foxp3^{+}$ reste incertaine. Récemment, il a été proposé que l'absence d'expression du facteur de transcription Helios puisse signer l'origine périphérique des Treg. Une autre étude ne semble pas aller dans le même sens (57)(58).

De même, l'identification des Tr1 est limitée par l'absence de marqueurs de surface spécifiques. Ces cellules productrices d'IL-10 n'expriment pas Foxp3. Elles expriment la molécule ICOS (pour « inducible T cell co-stimulator ») et PD-1 (pour « programmed death 1 ») mais ces marqueurs ne sont pas spécifiques. En revanche, il a récemment été décrit que les cellules Tr1 expriment de façon spécifique, chez la souris comme chez l'homme, les molécules CD49b et LAG-3 (pour « Lymphocyte activation gene-3 ») (47). CD49b est une intégrine $\alpha 2$, sous unité du « very late activation antigen » (VLA2). LAG-3 est un homologue de CD4 qui se lie au CMH de classe II avec une forte affinité.

Epigénétique

L'expression transitoire de *Foxp3* par les cellules $CD4^+$ périphériques leur confère une activité suppressive. Cependant, une expression constitutive est nécessaire à une fonction suppressive stable. Il a été démontré récemment un lien entre la réduction de la méthylation des îlots CpG du locus *Foxp3* et une augmentation de l'expression stable de *Foxp3* (59). La méthylation de dinucléotides diminue la transcription en empêchant la fixation de facteurs de transcription positifs et en recrutant des molécules répressives. Ainsi, un îlot de *Foxp3* riche en CpG est méthylé dans les cellules Treg suppressives et fortement méthylé dans les cellules T $CD4^+$ naïves, les cellules T $CD4^+$ activées et les cellules iTreg exprimant du TGF- β (59). Dans une étude récente il a été montré une diminution significative de la méthylation des îlots CpG au niveau du locus *Foxp3* des lymphocytes Treg mémoires $CD4^+CD45RO^+$ après 12 mois de désensibilisation sublinguale aux acariens et aux pollens de graminées combinés (60). L'étude des modifications épigénétiques dans les mécanismes de régulation dans l'asthme et l'allergie est à ses balbutiements. Cependant, les différences de méthylation de certains gènes impliqués dans la tolérance comme *Foxp3* pourraient constituer un marqueur d'induction de tolérance supplémentaire.

3.1.5. Mécanismes de suppression des T effecteurs par les Treg dans l'allergie

Les cellules Treg contrôlent la réponse immunitaire en inhibant l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices de diverses cellules cibles dont les lymphocytes effecteurs, les CPA et les cellules de l'immunité innée. Elles exercent leur activité inhibitrice à travers des mécanismes directs et indirects. Elles produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β , expriment des molécules inhibitrices telles que CTLA4 et diminuent l'expression du CMH de classe II et des molécules de costimulation CD80 et CD86 par les CPA.

De façon générale, les modes d'action des Treg peuvent être regroupés en 4 mécanismes de base (61) :

-la suppression par des cytokines inhibitrices : les cytokines inhibitrices incluent l'IL-10, l'IL-35 et le TGF- β .

-la suppression par la cytolyse : la cytolyse inclue des mécanismes dépendant de granzyme-A, granzyme-B et de la perforine.

-la suppression par perturbation métabolique : elle fait intervenir l'apoptose par déprivation cytokinique dépendante de CD25 (chaîne α du récepteur de l'IL-2), l'inhibition médiée par l'AMP cyclique et l'immunosuppression médiée par la génération de CD39 et CD73 par l'intermédiaire du récepteur à l'adénosine 2A ($A_{2A}R$).

-la suppression par la modulation de la maturation et de la fonction des CD : la suppression de la maturation des CD est médiée par l'interaction de LAG3 avec le CMH de classe II. La synthèse d'Indoleamine 2,3 Dioxygénase (IDO) est induite par l'interaction de CTLA4 et CD80/CD86. IDO est une molécule immunosuppressive synthétisée par les CD.

Les Treg Foxp3⁺ expriment leur potentiel régulateur de manière dépendante des contacts inter-cellulaires. En revanche, les Tr1 semblent exercer leur fonction en produisant plutôt des cytokines immunorégulatrices (61). Elles agissent sur les cellules naïves tout comme sur les cellules mémoires. Les cellules Tr1 doivent être activées par leur TCR pour pouvoir exercer leurs fonctions suppressives. Par la suite, elles peuvent avoir une activité suppressive vis-à-vis de cellules spécifiques d'autres antigènes par un effet « bystander ». Celui-ci est également assuré par les cytokines IL-10 et TGF- β qui agissent sur les CPA et les cellules effectrices.

Les cellules Treg Foxp3⁺ et Tr1 agissent probablement en synergie bien que leur mécanismes d'immunosuppression soient différents : cytokine-dépendant pour les Tr1 et cytokine-

indépendant pour les Treg Foxp3⁺. Leur importance relative est probablement dictée par la nature de l'antigène, le contexte de présentation de l'antigène et le type de tissu où la réaction immunitaire a lieu. Par ailleurs, ces deux types de cellules ont des capacités de migration différentes. Les cellules Treg Foxp3⁺ naturelles peuvent être recrutées et activées tôt lors de la réponse immunitaire alors que les Tr1, induites lors de stimulations antigéniques répétées peuvent agir dans un second temps pour diminuer la réponse immunitaire, restaurer et maintenir un état de tolérance (46). En ce qui concerne l'inflammation de nature allergique, les données expérimentales comme les données chez l'homme indiquent qu'une exposition locale chronique à l'allergène est indispensable pour maintenir l'activité des Treg, sinon leur effet suppresseur diminue (62).

Des modèles expérimentaux, il ressort que différentes cellules suppressives sont engagées suite à diverses voies d'exposition à l'allergène. Chez l'animal exposé de façon répétée à un antigène inhalé, l'inhibition de l'inflammation allergique est assurée par des Treg Foxp3⁺ exprimant le TGF- β associé à la membrane cellulaire (mTGF- β) (63). A l'inverse, lorsque la réaction inflammatoire est induite à distance (au niveau de la peau ou de la rate), l'IL-10 semble être plus importante dans l'immunorégulation de la réaction inflammatoire pulmonaire (64).

L'étude, chez l'homme, des modèles d'exposition à de fortes doses d'allergène a permis d'affiner la connaissance des réponses T régulatrices impliquées dans le développement de la tolérance. Chez les apiculteurs et les propriétaires de chats non allergiques, une grande partie des cellules T est représentée par des cellules Treg spécifiques des allergènes majeurs de l'abeille ou du chat. Chez ces individus « sains » qui n'ont pas de manifestations cliniques d'allergie, les Tr1 retrouvées, spécifiques d'antigène utilisent différents mécanismes immunosuppresseurs faisant intervenir l'IL-10, le CTLA4 et PD1 (43,65).

3.1.6. Pouvoir tolérogène des cellules dendritiques

Les CD sont importantes dans l'induction d'une immunité protectrice et d'une tolérance immunitaire. Chez l'homme, les différents types de CD sont les CD myéloïdes, les CD plasmacytoides et les cellules de Langerhans. Lors d'une exposition à un allergène, les CD mûrissent et migrent de la périphérie aux zones T des tissus lymphoïdes où elles produisent des cytokines régulatrices et sensibilisent les lymphocytes T naïfs.

L'induction physiologique d'une tolérance au niveau de la muqueuse des voies aériennes serait le résultat d'une diminution de la capture des antigènes par les CD de la muqueuse respiratoire, induite par une exposition répétée à l'allergène (66). A l'inverse, au cours d'une inflammation chronique des voies respiratoires, la fonction des CD des voies aériennes se trouve altérée et ces dernières évoluent vers un phénotype plus mature. Dans ce cas, elles seraient plus à même d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th2 lors de l'exposition à un allergène (67).

Le potentiel tolérogène des CD semble également être sous l'influence de certains médiateurs solubles comme le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF ou CCL18) ou l'IL-10. Lors d'une réponse immunitaire normale, les monocytes se différencient en CD tolérogènes en présence de GM-CSF et sensibilisent les cellules T régulatrices (Treg) pour favoriser en conséquence l'état de tolérance immunitaire. Chez le sujet allergique il a été décrit que les CD fixaient moins le GM-CSF (68,68–70). Certaines données indiquent également que dans un modèle d'asthme murin aux acariens, les CD différenciées en présence d'IL-10 (CD10) ont la capacité d'inhiber l'hyperréactivité bronchique d'une part en diminuant la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et la réponse IgE et IgG4 spécifique et, d'autre part, en favorisant la différenciation et/ou l'expansion des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ (71). A l'inverse, dans un modèle d'asthme à l'ovalbumine il a été décrit que l'IL-33 active les CD au cours de

la présentation de l'antigène et oriente la réponse lymphocytaire vers un phénotype Th2 après exposition à l'allergène (72).

3.2. Mise en place de la tolérance immunitaire *in utero* et chez le nourrisson

Les maladies allergiques et certaines maladies auto-immunes comme le DID et la maladie cœliaque apparaissent souvent dans l'enfance. Récemment, il a d'ailleurs été observé que l'âge d'apparition de ces pathologies était de plus en plus précoce (73). Les études épidémiologiques qui ont pu établir ces observations ont également montré que ce phénomène était d'autant plus flagrant dans les pays industrialisés.

Ces maladies sont dues à une rupture de tolérance vis-à-vis du soi ou d'allergènes ubiquitaires. Il est donc fortement probable qu'un déficit de mise en place de la tolérance *in utero* ou dans les premiers mois de vie soit à l'origine de ces observations.

En ce qui concerne l'allergie, l'étude de certains comportements alimentaires en fonction des régions géographiques ou des modes de vie est très instructive. Avec le développement des allergies alimentaires de nombreux conseils diététiques ont été prodigués afin de les éviter. Tout comme l'éviction des aéroallergènes est conseillée dans l'allergie respiratoire, il a été proposé pendant de nombreuses années d'éviter de donner certains aliments chez le nourrisson et de retarder leur introduction dans l'alimentation. Plutôt que de voir diminuer l'incidence des allergies alimentaires chez ces enfants, il a été observé, au contraire, une augmentation de la fréquence de ces allergies. Parallèlement, des études épidémiologiques ont été réalisées comparant des populations génétiquement proches mais évoluant dans des régions géographiques aux modes de vie différents. Ainsi, il a été décrit que l'allergie à l'arachide chez certaines populations juives était très rare en Israël. Lorsque ces mêmes

populations sont étudiées au Royaume-Uni, l'incidence de cette allergie est significativement plus élevée (74). Dans le premier cas, la consommation d'arachide est très fréquente et la cacahuète est introduite très tôt dans l'alimentation de l'enfant. Dans le second cas, la consommation d'arachide est plus rare et la cacahuète est introduite très tard dans l'alimentation.

Au vu de ces observations, certaines équipes ont proposé que la mise en place du système immunitaire *in utero* et dans les premiers mois de vie était déterminante dans le développement de la tolérance immunitaire (75–77).

Il nous semble pertinent de comprendre le développement du système immunitaire du fœtus jusqu'à l'âge adulte afin de saisir les différents éléments potentiellement à l'origine des maladies allergiques.

Le rôle des facteurs exogènes et les interactions génétique-environnement à l'origine du développement de l'allergie au cours de l'enfance ont souvent été restreints à la période postnatale. Cependant, de plus en plus d'études épidémiologiques, chez l'homme et l'animal (le plus souvent chez la souris), montrent l'effet indéniable de l'environnement, à travers la mère, sur le développement du système immunitaire fœtal (77).

Les lymphocytes humains, retrouvés à partir de 10 à 12 semaines de grossesse dans le thymus sont capables de fixer l'antigène dès 20 à 22 semaines de grossesse et développer une réponse spécifique d'allergène. Cependant, la spécificité des réponses retrouvées au niveau des cellules du sang de cordon n'est pas corrélée à l'exposition environnementale et il n'est pas certain que les lymphocytes détectés soient des lymphocytes mémoires. A la naissance, le système immunitaire humain est encore immature et les réponses immunitaires spécifiques d'antigène ont un profil de production de cytokines majoritairement Th2. L'exposition microbienne serait en première ligne dans le développement et la maturation des réponses

Th1, Th17 et Treg à partir de la naissance ainsi que dans la protection vis-à-vis du développement des allergies. Des études expérimentales indiquent que les modifications épigénétiques *in utero* auraient également une place dans la maturation du système immunitaire. En particulier, l'acétylation des histones active l'expression des gènes impliqués dans les réponses Th2 alors que la méthylation des gènes impliqués dans les réponses Th1 et Treg diminue leur expression. L'ensemble des événements qui surviennent *in utero* orientent le profil du système immunitaire de l'enfant à la naissance. On retrouve ainsi à la naissance une immaturité des réponses Th1 et Treg chez les enfants qui, plus tard, développeront une allergie. Des différences au niveau de l'immunité innée ont aussi été décrites.

Plusieurs facteurs endogènes et exogènes maternels pouvant influencer la maturation du système immunitaire ont été retrouvés. L'exposition maternelle microbienne pathogène et non pathogène semble jouer un rôle important dans la diminution du risque allergique. D'autres facteurs comme les nutriments (les folates entre autres), la fumée de cigarette, la prise de médicaments pendant la grossesse, l'exposition à certains polluants environnementaux (pesticides) seraient également impliqués. De façon surprenante, l'exposition aux allergènes de la mère ne semble pas avoir de retentissement notable. En revanche un facteur endogène important est le statut allergique de la mère qui, s'il existe, est associé à une diminution des réponses de type Th1 à des allergènes environnementaux et à des alloantigènes (78–81).

Par ailleurs, de nombreuses études ont été réalisées sur l'effet de l'allaitement maternel sur le développement de certaines maladies. Les résultats sont contradictoires mais dans l'ensemble, les allergies alimentaires et respiratoires ainsi que certaines maladies auto-immunes comme le DID semblent être moins fréquentes chez les enfants ayant bénéficié d'un allaitement maternel (82,83). Des études réalisées chez la souris puis chez l'homme ont permis de décrire certains mécanismes pouvant intervenir et expliquer le développement de la tolérance chez le nouveau-né au cours de la lactation (75,76,81). Les allergènes respiratoires comme les

allergènes alimentaires sont transmis au nourrisson. Ils sont modifiés chez la maman au niveau du système digestif afin de produire des peptides tolérogènes. Puis ils sont transmis par le lait au nouveau-né en même temps que des IgA et des IgG. Au niveau de la muqueuse intestinale, les peptides sont soit libres, soit complexés à des IgG ou à des IgA. Ceux associés aux IgA ne passent pas la barrière intestinale alors que ceux associés à des IgG la traversent grâce à la fixation du fragment Fc des immunoglobulines au récepteur Fc néonatal (FcRn) présent à la surface des cellules intestinales. Les peptides libres peuvent également traverser la barrière grâce aux cellules M au niveau des plaques de Peyer ou grâce aux CD. Les peptides transférés par l'intermédiaire du FcRn induisent des Treg et sont plus tolérogènes que ceux transférés sous forme libre. L'exposition de l'enfant aux allergènes acheminés de cette manière permettrait le développement de Treg spécifiques et une induction de tolérance.

Il a également été décrit, notamment chez la souris, que l'exposition à des aéroallergènes par ce biais pouvait diminuer le risque d'allergies respiratoires (81).

D'autres mécanismes participent aussi à la mise en place de la tolérance lors de l'allaitement maternel. La présence de facteurs de croissance comme l'epidermal growth factor (EGF) et le TGF- β accélèrent la maturation du tube digestif de l'enfant. La transmission concomitante de TGF- β par le lait participe également à l'induction de tolérance, le TGF- β ayant un rôle clé dans l'induction de Treg Foxp3⁺ et de Tr1.

Chez la souris, la présence dans le lait maternel de TGF- β et de l'antigène auquel est exposée la mère permet d'induire une tolérance spécifique de l'antigène chez le souriceau et le protège de l'asthme (81). Chez l'homme, il a été décrit qu'à 11 jours de vie, la quantité de TGF- β dosé dans le lait maternel était corrélée avec l'apparition de sifflements chez le nourrisson durant la première année de vie (84). La quantité de TGF- β dans le colostrum est aussi corrélée au développement d'atopie dans la première année de vie (85). Par ailleurs, la

supplémentation de l'alimentation de femmes enceintes en micro-organismes vivants ou probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* ou *Bifidobacterium lactis* en l'occurrence) à partir de 5 semaines avant l'accouchement est associée à une augmentation du TGF- β dans le lait maternel durant la première semaine d'allaitement (86). L'allaitement semble jouer également un rôle dans le développement du microbiote intestinal et notamment la présence de bifidobactéries, ce qui influence le développement de la tolérance orale. En effet, chez la souris, la modification du microbiote intestinal a été associée à la diminution du développement du DID ou de l'allergie respiratoire (87,88). De même, chez l'homme, l'influence de l'environnement en période périnatale (la césarienne, l'allaitement, l'administration d'antibiotiques, la supplémentation en probiotiques) semble avoir un rôle important dans le développement du microbiote et des maladies atopiques comme le montrent d'ailleurs de nombreuses études interventionnelles. Cependant, les résultats restent souvent divergents (89–92).

3.3. Profil de la réponse immunitaire chez le sujet allergique et chez le sujet sain

Le répertoire des cellules T des individus sains et celui des individus allergiques reconnaissent les mêmes épitopes dominants cellulaires T allergéniques. La réponse immunitaire de ces 2 groupes diffère dans l'équilibre entre les Treg et les Th2, toutes deux spécifiques d'antigène. Les lymphocytes Treg jouent un rôle important dans le maintien actif de la tolérance périphérique aux allergènes chez les sujets sains non atopiques. De l'équilibre entre les cellules régulatrices et les cellules effectrices Th2 dépend le développement de l'allergie ou le maintien de la tolérance vis-à-vis des allergènes de l'environnement (42,93).

3.3.1. Cellules régulatrices

Chez l'individu sain, la réponse immunitaire vis-à-vis des allergènes peut être considérée comme une non réponse des cellules T ou l'induction d'une tolérance périphérique active par les cellules T régulatrices (figure 4). Les Tr1 comme les Treg $CD4^+CD25^+$ spécifiques d'antigène jouent un rôle et on constate une augmentation du TGF- β et de l'IL-10 dans une culture de PBMC, après une stimulation allergénique, chez un individu sain. Par ailleurs, ils suppriment la synthèse d'IgE spécifiques et induisent des IgG4 en culture (43,94,95). Ils ont également une action sur les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles (96).

Les CD sont des cibles de la tolérance immune médiée par les Treg. Chez l'individu sain, les Treg $CD4^+CD25^+$ induisent des CD tolérogènes par l'intermédiaire de l'IL-10 alors que chez les individus asthmatiques l'induction de ces CD est moins efficace et est corrélée à la sévérité de l'asthme (97).

L'étude du pouvoir suppresseur des Treg chez les patients allergiques a montré qu'il était souvent déficient. L'action suppressive des cellules $CD4^+CD25^+$ en culture est plus forte chez les individus sains que chez les individus allergiques pendant la saison pollinique, chez l'adulte comme chez l'enfant (93,98–100). De la même façon, on retrouve une réponse insuffisante des cellules $CD4^+CD25^+$ et une réponse IL-4 excessive chez les patients asthmatiques allergiques aux acariens comparés aux patients sensibilisés non allergiques (101). Chez les enfants asthmatiques, le pourcentage des cellules $CD4^+CD25^+$ au niveau des voies aériennes est plus faibles que chez les enfants sains (102). Chez les patients atteints de DA, l'infiltration cutanée de $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ est déficiente (103). Enfin, chez un individu allergique, lors d'une réponse immunitaire à un allergène, des Treg spécifiques sont induits mais l'induction est moindre que chez un individu sain (104). La présence de cytokines Th2 et particulièrement l'IL-4 et l'expression du facteur de transcription GATA3 (pour « trans-acting

T-cell-specific transcription factor ») inhibent l'expression de Foxp3 dans les cellules CD4+ ce qui pourrait expliquer la faible fréquence des Treg chez ces patients (105).

Les cellules Tr1 représentent le type de cellules régulatrices spécifiques d'allergènes environnementaux communs le plus fréquemment retrouvé. Une étude a comparé des sujets sains à des sujets allergiques aux acariens ou aux pollens de graminées. Chez les sujets sains, les cellules Tr1 sécrétrices d'IL-10 et spécifiques d'allergènes sont plus fréquentes, dans le sang périphérique. Cette population a une activité suppressive spécifique d'antigène lorsqu'elle est peu représentée. Lorsqu'elles sont présentes en plus grandes quantités, les cellules Tr1 ont une activité suppressive non spécifique (95).

Comme nous l'avons déjà décrit, l'étude d'une population d'apiculteurs non allergiques au venin d'abeille a permis d'approfondir la connaissance des mécanismes de tolérance chez l'individu sain ou ne présentant pas de signes cliniques d'allergie. Ces apiculteurs ont été suivis plusieurs années pendant la saison et en dehors de la saison de récolte du miel. Pendant la saison, les apiculteurs se font piquer à répétition et sont exposés, de cette façon, à de fortes doses de venin d'abeille. Hors saison, les cellules T mémoires spécifiques (de l'allergène dominant, la phospholipase A2) ont un profil producteur d'IL-4 et d'IFN γ prédominant. Lors de la saison de récolte du miel le profil devient essentiellement Tr1 au détriment des cellules Th1 et Th2. Cette modification est transitoire et a lieu lors de l'exposition à de fortes doses d'allergènes. Deux à trois mois après la saison, le profil de production de cytokines revient à celui retrouvé initialement. Cette étude décrit également une clonalité au sein des cellules T spécifiques de l'allergène, produisant de l'IL-4 et de l'IFN γ hors saison et ayant un profil plutôt Tr1 sécréteur d'IL-10 pendant la saison, en réponse à l'exposition à de fortes doses d'allergène (106).

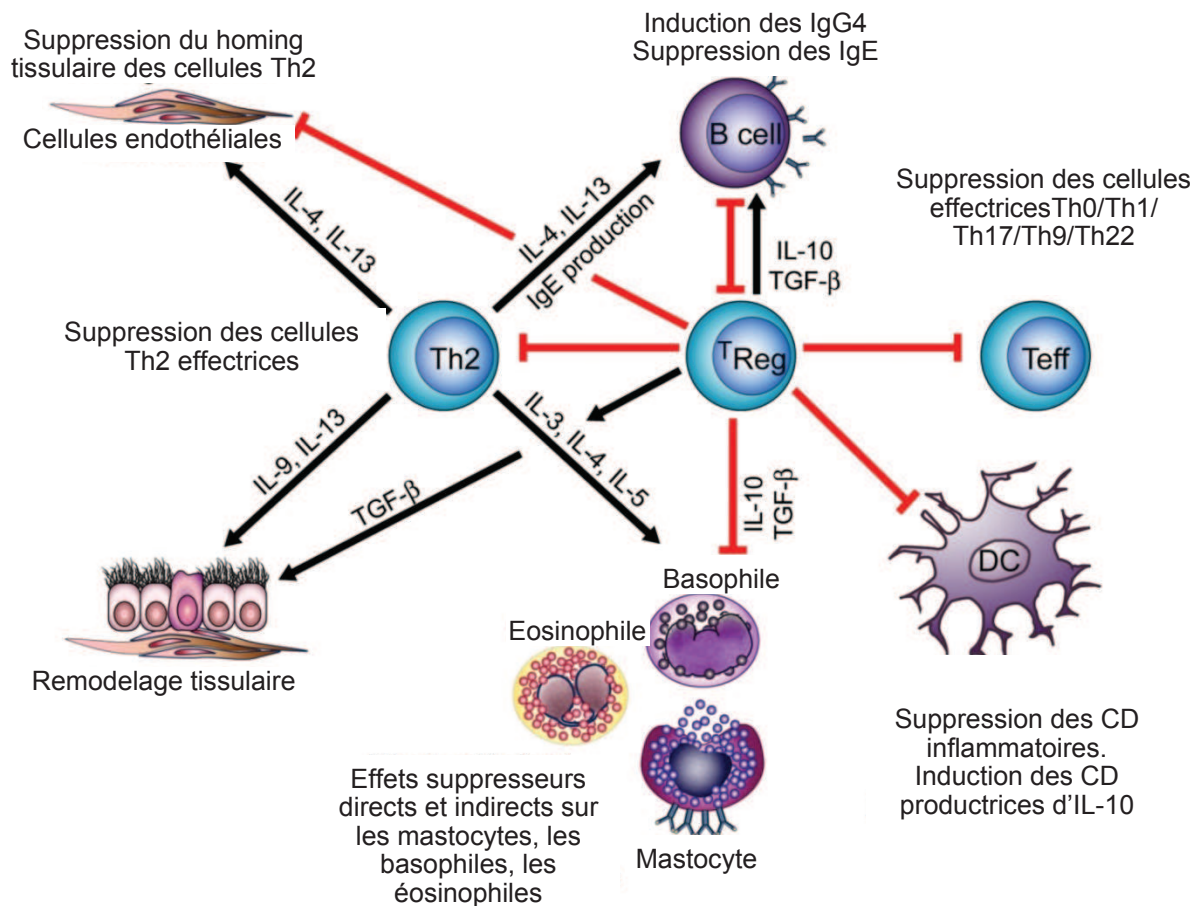


Figure 4. Rôle des lymphocytes T régulateurs (Treg Foxp3⁺ et Tr1) dans le contrôle de la réponse allergique. Adapté de Akdis et al, JACI, 2011

3.3.2. Cellules effectrices

Les différentes cellules T effectrices

On distingue différentes populations de lymphocytes T CD4⁺ en fonction de leurs capacités fonctionnelles, y compris capacité à produire différents profils de cytokines. Dans les années 80 ce sont les travaux de T. Mosman et R. Kaufman qui les premiers ont décrit, initialement chez la souris, la dichotomie entre les lymphocytes CD4⁺ Th1 (pour T « helper » de type 1) et les lymphocytes CD4⁺ Th2 (pour T « helper » de type 2) (107). Les lymphocytes Th1 sont principalement producteurs d'IL-2, de TNF et d'IFN γ et, de ce fait sont impliqués dans les

réponses immunitaires cellulaires (réactions d'hypersensibilité retardée, lymphocytaires cytotoxiques et activation des macrophages). Les lymphocytes Th2 sont principalement producteurs d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6 et d'IL-13 et sont impliqués dans les réponses immunitaires humorales, les réactions d'hypersensibilité immédiate, la production d'IgE et les réponses allergiques, qui nous intéressent tout particulièrement. Les lymphocytes Th2 sont également impliqués dans l'immunité anti-parasitaire. Les gènes codant l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 se situent au niveau du chromosome 5q, proches de celui codant le GM-CSF ou « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ». L'IL-4 et l'IL-13 induisent la commutation isotypique des cellules B vers l'isotype IgE et l'expansion clonale des cellules B mémoires et naïves. L'interleukine-5 recrute les éosinophiles (avec l'IL-4 et l'éotaxine), les active et prolonge leur survie. (Figure 5)

Cette différence de production de cytokines entre cellules Th1 et Th2 sous-tend le concept de déviation immune. Il est important de citer que ce sont les travaux du groupe de S. Romagnani qui ont démontré que la dichotomie Th1/Th2 existait également chez l'homme (108). Des données convergentes de la littérature suggèrent que l'allergie résulte d'un déséquilibre de la capacité fonctionnelle des cellules Th2 spécifiques de l'allergène et des différentes sous-populations de cellules Treg que nous avons présentées.

En 1983, les premiers travaux décrivant l'isolement de lymphocytes spécifiques d'allergène (le seigle et les acariens) à partir de patients atopiques ont été rapportés. Ces travaux confirmaient que, la capacité proliférative de ces lymphocytes CD4⁺ vis-à-vis de l'allergène était restreinte par le CMH de classe II (en particulier, les molécules DR) (109). A ce jour les épitopes reconnus par les lymphocytes Th2 ont été identifiés uniquement pour environ 17% des allergènes répertoriés par l'IUIS (international union of immunological societies) (110).

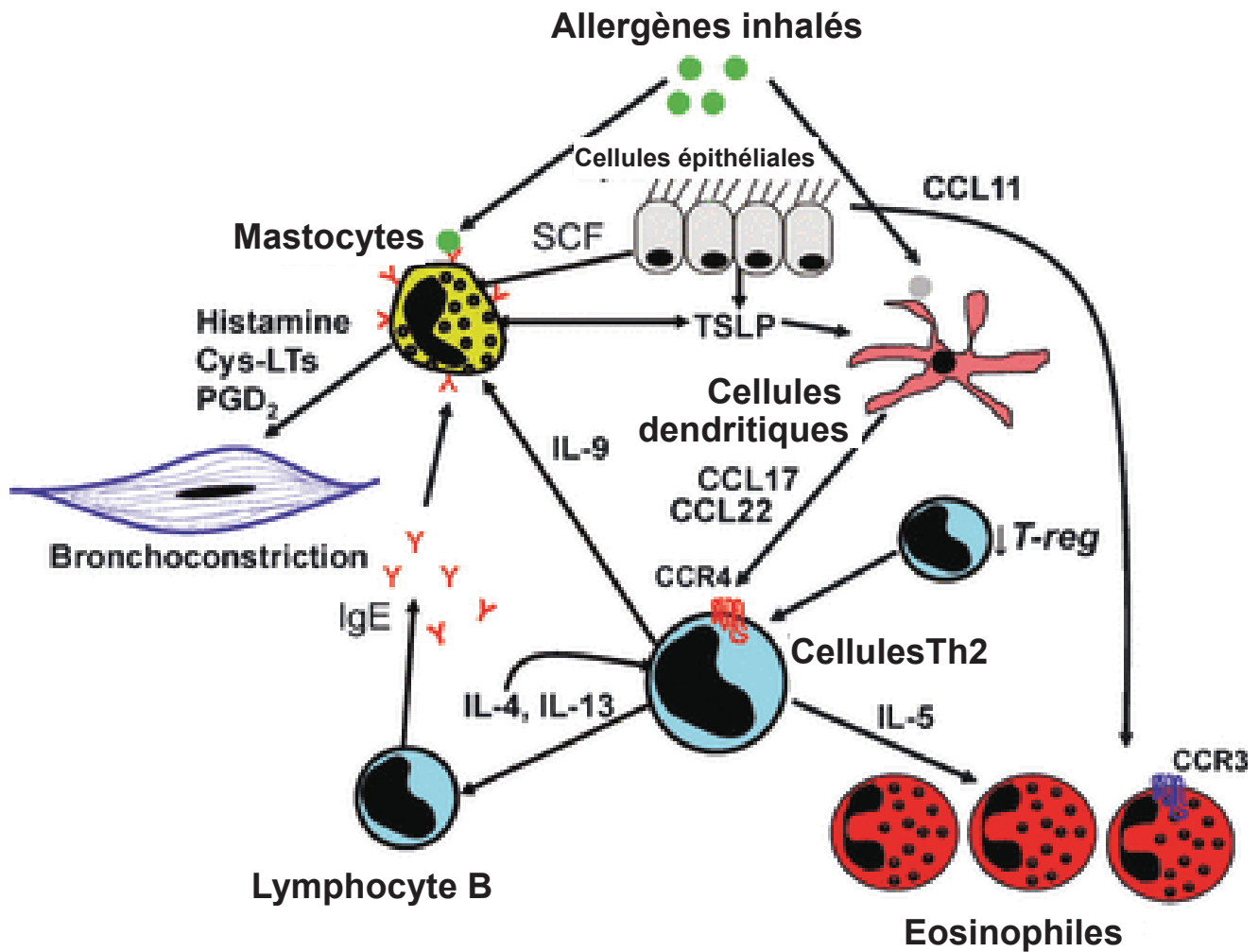


Figure 5. Pathophysiologie de l'inflammation allergique. Adapté de PJ Barnes Immunol Rev 2011.

Au fil des années, il est apparu clairement que la déviation immune n'inclue pas uniquement les lymphocytes Th1 et Th2 : ainsi ont été décrites les cellules pro-inflammatoires Th17 productrices d'IL-17A (111,112) et les cellules Th9, productrices d'IL-9 (113) (figure 6). Aux différentes cytokines produites sont associés des facteurs de transcriptions distincts : Tbet (pour « T-box expressed in T cells »), sous-tend la production d'IFN γ et est exprimé par les cellules Th1, GATA-3 sous-tend la production d'IL-4 et est exprimé par les cellules Th2, et (ROR) γ t/ROR α (pour « retinoid related orphan receptor ») sous-tend la production d'IL-17A

et est exprimé par les cellules Th17. Comme nous l'avons dit, l'équilibre entre ces cellules est important dans le développement et l'orientation de la réponse immunitaire et il existe des phénomènes de contre-régulation. Ainsi, il est bien connu que l'activation de Tbet inhibe le recrutement des cellules éosinophiles assuré par les cellules Th2 et le recrutement des polynucléaires neutrophiles au niveau des voies aériennes assuré par les cellules Th17 (114).

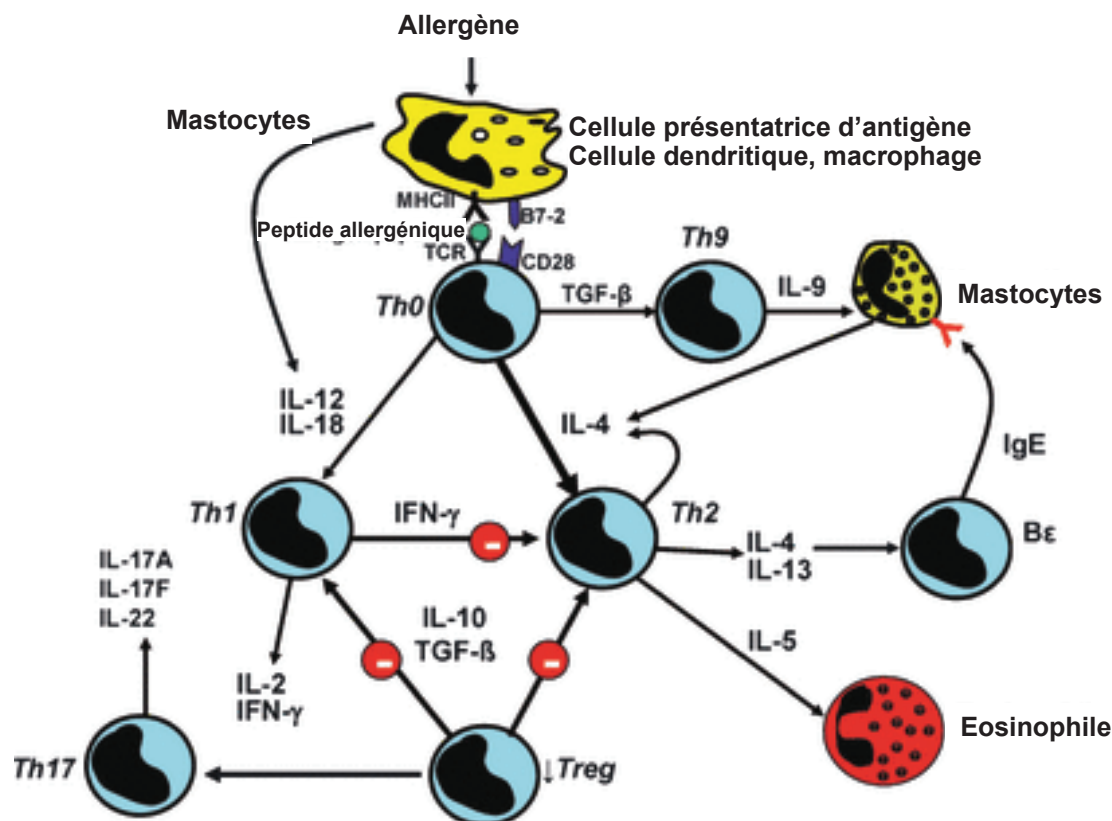


Figure 6. Les lymphocytes T dans l'allergie. Adapté de PJ Barnes Immunol Rev 2011.

Développement des cellules Th2

Le microenvironnement en termes de types cellulaires et de cytokines est essentiel pour la polarisation des lymphocytes $CD4^+$ vers un phénotype Th2 mais les mécanismes moléculaires précis à la base de cette orientation ne sont que partiellement connus. L'interaction entre les cellules de l'immunité innée et les cellules de l'immunité adaptative est au cœur de la

différentiation des cellules CD4⁺ naïves en cellules Th2. Les infections virales, les allergènes ou un stress mécanique peuvent activer l'épithélium des voies aériennes ou de la barrière cutanée et induire ainsi la sécrétion d'IL-25, IL-33 et de TSLP (pour « thymic stromal lymphopoietin »). Le TSLP et l'IL-33 agissent sur les CD pour qu'elles polarisent les cellules Th2. L'IL-25 et l'IL-33 activent les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2), les nuocytes dénommés également « natural helper cells ». Ces cellules sécrètent de l'IL-5, de l'IL-9 et de l'IL-13 qui favorisent la différenciation, la survie et l'expansion des cellules Th2. L'IL-25 agit également sur les cellules myéloïdes de type 2 (T2M) qui produisent de l'IL-4 et de l'IL-13. Des études récentes qui décrivent l'existence des cellules ILC2 et T2M chez l'homme confirment leur rôle important dans la polarisation des cellules Th2 et leur expansion (115–118).

Le TSLP joue un rôle important dans l'inflammation allergique, à l'interface entre les cellules épithéliales et les CD: il active les CD myéloïdes humaines de manière à favoriser leur capacité de polariser, à leur tour, les lymphocytes en cellules Th2. Les CD matures migrent au niveau des ganglions lymphoïdes pour activer la phase adaptative de la réponse inflammatoire allergique. Le TSLP induit l'expression de OX40L sur les CD, ce qui induit l'augmentation de sécrétion d'IL-4 qui à son tour favorise la polarisation des cellules Th2 (119).

La raison pour laquelle le développement et la prolifération des cellules Th2 sont favorisés chez les personnes allergiques n'est pas claire. Une différence d'avidité du TCR pour le complexe CMH/peptide pourrait entrer en jeu. Les CD semblent également produire plus d'IL-10 et moins d'IL-13 chez les sujets non allergique par rapport aux sujets allergiques (120). Le terrain génétique joue aussi un rôle important. D'une part, dans l'association du CMH au terrain allergique : une personne ayant un CMH capable de présenter un allergène particulier a une tendance à l'allergie plus importante qu'un individu qui n'a pas ce CMH. D'autre part, l'immunorégulation varie d'un sujet à l'autre : selon les polymorphismes

présents au niveau des promoteurs des gènes des cytokines pro-inflammatoire, un individu a une tendance plus ou moins marquée à produire des cytokines pro-Th2 (121–123).

Phénotypes des cellules Th2

La récurrence des symptômes d'allergie après des périodes sans exposition à l'allergène s'explique par la présence de cellules Th2 mémoires qui expriment CD45RO, contrairement aux cellules naïves exprimant CD45RA. Les cellules T mémoires centrales (T_{MC}) expriment CCR7- (pour « C-C chemokine receptor ») de type 7 et se rendent au niveau des organes lymphoïdes secondaires où elles rencontrent l'antigène, prolifèrent et donnent naissance à des cellules T effectrices. Les cellules T mémoires effectrices (T_{ME}), qui n'expriment pas CCR7, migrent directement au niveau des tissus où a lieu l'inflammation et exercent leurs activités effectrices (124) (figure 7).

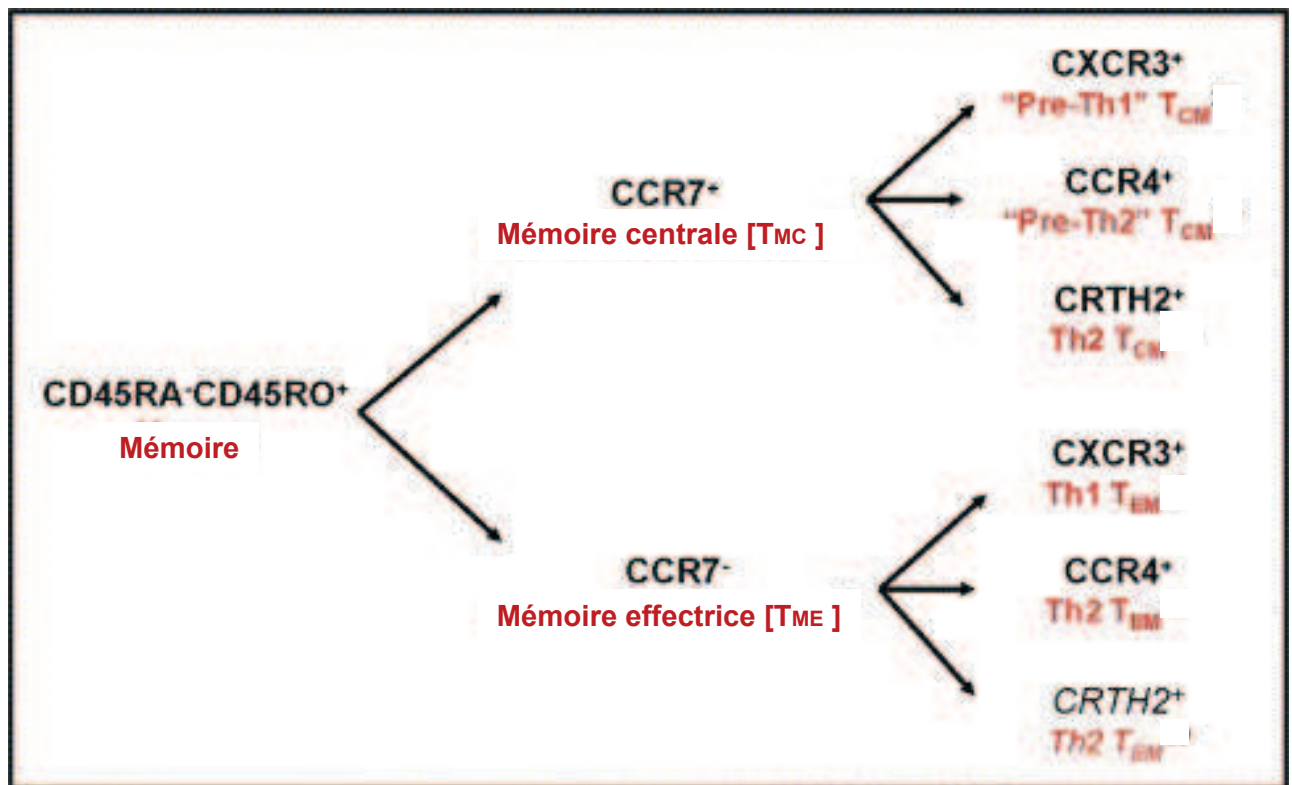


Figure 7. Propriétés phénotypiques des cellules T CD4⁺ mémoires humaines. Adapté de JA Woodfolk et al., JACI, 2008

Il n'existe pas un seul et unique marqueur de surface permettant de différencier les cellules Th1 des cellules Th2. C'est plutôt un ensemble de marqueurs et de cytokines qui permet de les caractériser. Les cellules T_{CM} exprimant CCR4 et produisant de l'IL4 (les pré-Th2) se différencient en cellules Th2 effectrices mémoires alors que les cellules T_{CM} exprimant CXCR3 (pour « C-X-C motif receptor 3 ») et sécrétant de l'IFN γ (les pré-Th1) se différencient en cellules Th1 effectrices mémoires. La molécule CCR4 n'est pas restreinte aux cellules Th2. Elle est également exprimée par les cellules T mémoires au niveau cutané, par les cellules mémoires ayant les potentiels Th1 et Th2 combinés et également par certaines cellules Treg.

Dans les années 1990, un récepteur couplé à une protéine G, le CRTH2 (pour « recepteur chemoattractant » exprimé sur les cellules Th2) a été décrit à la surface des cellules humaines Th2. Ce récepteur aux prostaglandines D2 est exprimé sur 0,4 à 6,5% des cellules CD4⁺ mémoires circulantes (CD4⁺CD45RO⁺CD45RA⁻). L'activation de leur TCR induit préférentiellement la sécrétion d'IL-4, d'IL-15 et d'IL-13 (124).

L'étude des cellules Th2 spécifiques d'allergènes montre que la majorité exprime CCR4. Certaines molécules de « homing » comme CLA (pour « cutaneous lymphocyte antigen ») sont retrouvées au niveau des cellules T mémoires, préférentiellement chez les individus allergiques à l'arachide, contrairement à l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, ce qui suggère que la sensibilisation advient par l'intermédiaire de la peau (125). Par ailleurs, chez les patients allergiques à l'aulne, les cellules mémoires spécifiques de l'antigène majeur Aln g 1 n'expriment pas CD27 mais sont CRTH2⁺ et produisent de l'IL-4 alors que les cellules spécifiques d'Aln g 1 des sujets non allergiques à l'aulne expriment CD27, sécrètent de l'IFN γ et de l'IL-10. La perte d'expression de CD27 est un marqueur de différenciation cellulaire (126).

Récemment, il a été décrit une hétérogénéité au sein des cellules Th2 dans l'allergie alimentaire avec une population Th2 IL-4⁺IL13⁺ et une population Th2 IL4⁺IL13⁺IL5⁺ dérivée de la précédente et plus différenciée. Elles seraient associées à différents types d'allergies : l'allergie à l'arachide dans le premier cas et l'œsophagite à éosinophile dans le deuxième (127,128).

Comme il a déjà été fait mention, des cellules spécifiques d'antigène sont également retrouvées chez les sujets non allergiques. Cependant, leur fréquence semblerait être plus faible, l'avidité du TCR de leurs cellules T mémoires spécifiques d'antigène moindre que chez les personnes allergiques (126,129–131) et leur profil de sécrétion de cytokines différent (orienté Th0, Th1 ou Treg, figure 6).

3.4. L'immunothérapie spécifique d'allergène

L'immunothérapie spécifique d'allergène (ITA) fût initialement expérimentée par Noon en 1911. Elle consiste en l'administration croissante de faibles doses d'antigène afin d'induire une immunosuppression spécifique d'antigène. Initialement sous-cutanée, elle est actuellement également sublinguale. C'est l'unique traitement permettant d'induire des cellules régulatrices spécifiques de l'allergène chez l'homme. Son rôle est reconnu dans le traitement de la rhinite allergique, de l'asthme léger (132) et de l'allergie aux venins (133). Son efficacité a aussi été prouvée dans la prévention du passage de la rhinite allergique à l'asthme (134,135). Par ailleurs, l'ITA diminue le risque de développer de nouvelles sensibilisations allergéniques (136,137).

En plus de son action sur la réponse immédiate à l'allergène, l'ITA exerce également un rôle sur la réponse tardive qui fait intervenir le recrutement, l'activation et la persistance des

éosinophiles et des cellules T activées sur le site d'exposition à l'allergène (la muqueuse nasale ou bronchique, la peau). L'ITA permet une augmentation de la concentration d'allergène nécessaire à l'induction de la réponse immédiate et tardive, spécifique et non spécifique : l'hyperréactivité bronchique, nasale et conjonctivale non spécifique diminue après une ITA.

Le but de l'ITA est d'induire une tolérance immunitaire et de modifier la réponse immune spécifique de l'allergène de telle sorte qu'à l'arrêt du traitement l'effet bénéfique, c'est-à-dire l'absence de réponse pathogène cliniquement visible, puisse persister (138). L'action sur les cellules T pathogènes et sur les cellules T régulatrices est primordiale pour atteindre cet effet persistant.

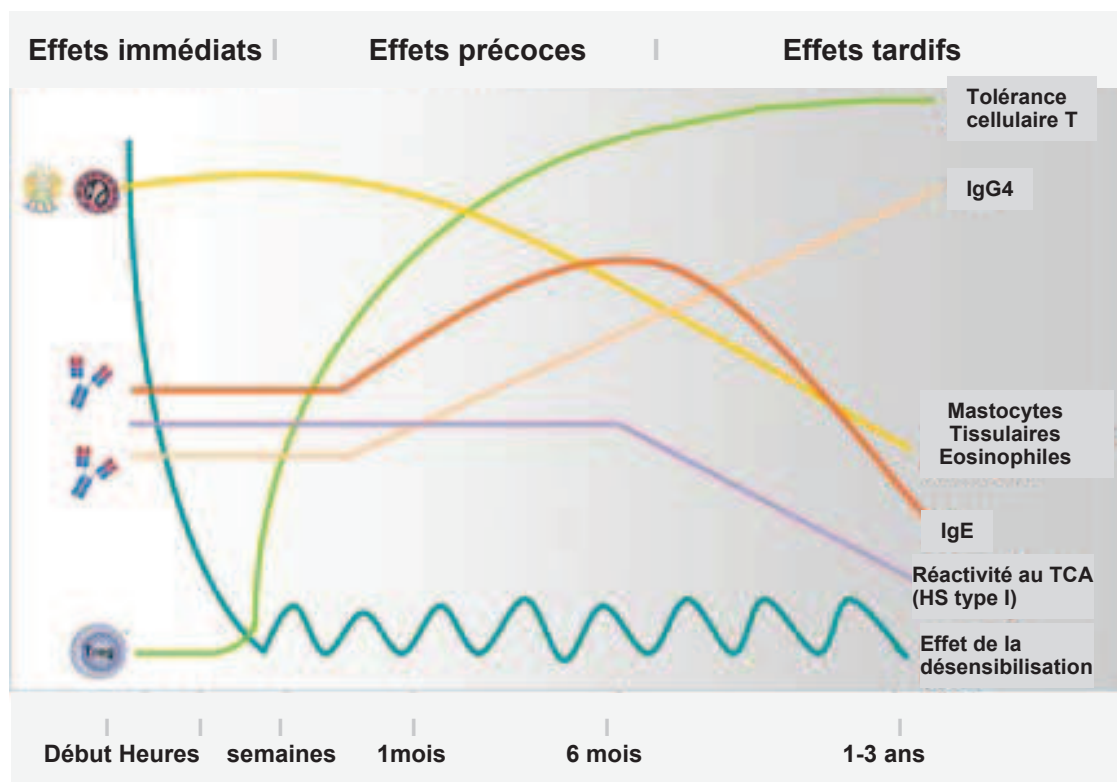


Figure 8. Mise en place de la tolérance périphérique au cours de l'immunothérapie spécifique d'allergène. Adapté de Soyer, Allergy, 2013

Les différents mécanismes connus à ce jour pour expliquer l'efficacité de l'ITA reposent sur un changement de profil de la réponse des cellules T et B mémoires spécifiques d'allergène pour orienter la réponse immunitaire vers un mode non inflammatoire, et la diminution de l'activation, de la migration tissulaire et de la dégranulation des cellules mastocytaires, des basophiles et des éosinophiles (139) (figure 8). Il est aussi décrit une action sur les cellules dendritiques de la muqueuse orale la désensibilisation sublinguale.

Les cellules T régulatrices

Le phénomène de tolérance périphérique serait initié par les cytokines IL-10 et TGF- β que les Treg produisent en quantité croissante au cours de la désensibilisation (94,143). Les cellules Tr1 sécrétrices d'IL-10 tout comme les cellules Treg Foxp3⁺ joueraient un rôle. La majeure partie des études sont faites sur le sang périphérique étant donné les difficultés de prélèvement chez l'homme. Il a été montré cependant que les cellules CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ainsi que l'expression du TGF- β augmentent sur le site de l'inflammation (la muqueuse nasale) au cours de l'ITA aux pollens de graminées, parallèlement à l'amélioration clinique (144)(145). De la même façon, une augmentation des cellules Foxp3⁺ a été observée dans la muqueuse sublinguale après une ITA sublinguale aux pollens de graminées (146). De fait, les Treg expriment des molécules d'adressage, les récepteurs aux chémokines qui leur permettent de migrer vers certains tissus préférentiels. Entre autres, l'expression de CCR4, CCR5, CCR6 et CCR8 a été décrite sur les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ comparées aux cellules T effectrices (147). Il a également été décrit qu'après une désensibilisation aux acariens l'expression des molécules CCR5 et CD19d augmentait sur les cellules CD4⁺IL-10⁺ (148). De façon similaire, après une désensibilisation aux pollens, les molécules CCR4, CCR10, CLA et l'intégrine β 7 augmentaient sur les Tr1 (149).

Les cellules T effectrices

L'action des Treg et des Tr1 sur les cellules T effectrices spécifiques d'antigène a été récemment objectivée par l'étude *ex vivo* de ces cellules. La désensibilisation aux pollens de bouleau et d'aulne a été associée à la diminution des cellules Th2 spécifiques des allergènes Bet v 1 et Aln g 1 (126,153,154). De la même façon, une diminution des cellules spécifiques de Ves v 5 a été observée au début de la désensibilisation au venin de guêpe (155).

Un mécanisme pouvant expliquer cette observation est la délétion clonale liée à l'antigène. Les cellules Th2 sélectivement délétées durant l'AIT auraient probablement une susceptibilité accrue à l'apoptose (par leur statut de différenciation avancée) alors que les cellules Th1 et Tr1 persistent et deviennent dominantes (126,156,157). L'élimination des cellules Th2 permettrait également le développement des Tr1 puisque les cytokines Th2 inhibent le développement des Tr1 et rendent les cellules Th2 résistantes aux mécanismes de suppression des cellules T régulatrices (105,158–160). Cependant, il a également été proposé que l'anergie puisse être à l'origine de la disparition des cellules Th2 (148,153). Enfin, l'absence d'interaction Th2-Tr1, du fait de la disparition des cellules Th2, pourrait également expliquer la diminution secondaire des Tr1.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les cellules Tr1 et Treg peuvent partager un même précurseur avec les cellules Th2 (155).

Les lymphocytes B

Les lymphocytes B montrent, au cours de la désensibilisation, une déviation de leur production d'IgE vers une production d'IgG4. Initialement, on observe une augmentation de la concentration sérique des IgE spécifiques de l'allergène suivie d'une diminution au fur et à mesure des années. Parallèlement, la concentration sérique d'IgG4 spécifiques de l'allergène augmente précocement et rapidement. L'IL-10 produite par les Treg est à l'origine de la diminution des IgE et de l'augmentation de production des IgG4 (106). L'amélioration

clinique observée au cours de la désensibilisation ne peut être liée à la diminution des IgE qui est tardive et probablement liée à la persistance de cellules plasmocytaires produisant des IgE, résidant dans la moelle osseuse et ayant une longue durée de vie.

La particularité des IgG4 est de rentrer en compétition avec les IgE pour leur fixation sur les récepteurs Fcε des mastocytes et des basophiles afin d'empêcher l'activation et la dégranulation des cellules effectrices. Les IgG4 sont fonctionnellement monomériques en raison de leur capacité à échanger des fragments de chaîne lourde avec d'autres molécules d'IgG4 ayant des spécificités antigéniques différentes. Ceci est à l'origine d'une diminution du pontage ou « cross-linking ». Les IgG4 ont également une affinité diminuée pour le récepteur Fcγ et ne fixent pas le complément (161,162).

Les polynucléaires basophiles et les cellules mastocytaires.

L'ITA module le niveau d'activation des mastocytes et des basophiles et diminue la libération d'histamine induite par les IgE. Les médiateurs inflammatoires sont alors libérés en quantité inférieure à celle nécessaire au développement d'une réaction anaphylactique (140). Parmi les mécanismes proposés, il a été décrit que l'IL-10 diminuait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules mastocytaires (141) et que les Treg inhibaient la dégranulation des mastocytes dépendante du FcεRI (récepteur du fragment constant des IgE de type I, de haute affinité) par un contact cellulaire direct (96,142).

Les cellules présentatrices d'antigène : particularités de la désensibilisation sublinguale

Le rôle des cellules dendritiques (CD) dans l'ITA a particulièrement été décrit dans la désensibilisation sub-linguale. Chez l'homme, les cellules de Langerhans (CD1a⁺/langerhin⁺) sont nombreuses dans la muqueuse orale. Ces CD myéloïdes expriment le FcεRI, et certains TLR comme le TLR2 et le TLR4 et sont appelées « cellules de Langerhans de la muqueuse

orale » (oLC) (163). Elles peuvent directement capturer l'allergène et migrer vers les ganglions lymphatiques drainants sous-maxillaires. Ces CD sont majoritairement tolérogènes. Produisant notamment de l'IL-10 et du TGF β , elles induisent la différenciation cellulaire des lymphocytes T CD4⁺ vers les phénotypes Treg et Th1 (67,164).

Le rôle de l'IL-10

Les cellules présentatrices d'antigène (comme les cellules B et les CD), et les cellules Tr1 contribuent à l'effet suppresseur de l'IL-10. L'IL-10 supprime les cellules T en bloquant les co-sigaux activateurs CD2, CD28 et ICOS. Elle exerce également une action inhibitrice sur les monocytes et les macrophages activés en diminuant l'expression de molécules de costimulation et du CMH de classe II. Par ailleurs, l'IL-10 régule la formation des isotypes en favorisant un phénotype non inflammatoire : elle supprime les IgE totales et les IgE spécifiques et augmentent parallèlement les IgG4. Enfin, l'IL-10 réduit la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules mastocytaires, diminue l'activité des éosinophiles et supprime la production d'IL-5 par les cellules Th0 et Th2 (141).

Le rôle du TGF- β

Le TGF- β permet la conversion des cellules naïves CD4⁺CD25⁻ en cellules suppressives CD4⁺CD25⁺ par l'intermédiaire de l'induction de Foxp3. Il est également nécessaire à l'expansion *in vivo* des cellules T CD4⁺CD25⁺ et au développement de leurs capacités immunosuppressives (33,165).

Les marqueurs biologiques de l'efficacité de l'immunothérapie spécifique d'allergène

Il n'existe actuellement pas de marqueur biologique de l'efficacité de l'ITA utilisable en clinique, bien que celle-ci ait été prouvée cliniquement à maintes reprises (166,167). De la

même façon, aucun marqueur biologique n'est susceptible de prédire la réponse ou l'absence de réponse à un traitement par ITA.

Immunité humorale

Le suivi de l'évolution de la concentration sérique des IgE spécifiques ne semble pas être concluant car la concentration augmente dans un premier temps avant de diminuer tardivement. Le rapport des concentrations sériques IgE spécifiques/IgE totales a récemment été proposé comme marqueur pour prédire la réponse clinique à l'ITA. L'augmentation du taux sérique d'IgG4 corrélant avec l'efficacité clinique de l'ITA, il a été suggéré que ce pourrait être un marqueur de la tolérance immunitaire acquise et de la diminution de la sensibilisation à l'allergène. Cependant, les études sont contradictoires et il est possible que le taux d'IgG4 soit le reflet d'une forte exposition à l'allergène plutôt que d'une réponse efficace à une ITA (168).

Plus récemment, l'étude du pouvoir « inhibiteur » du sérum a été corrélée à l'efficacité clinique de l'ITA (169,170). Ces tests fonctionnels étudient le pouvoir bloquant des IgG sériques, c'est-à-dire la suppression de la libération de l'histamine dépendante du FcεRI par les basophiles ainsi que l'inhibition de la liaison du complexe IgE-allergène dépendant du FcεRII (ou CD23, récepteur du fragment constant des IgE de type II, de faible affinité) à la cellule B. Au cours d'une ITA aux pollens de graminées, 2 ans après l'arrêt du traitement, contrairement à la diminution des IgG1 et IgG4, l'activité inhibitrice des IgG persiste bien que diminuant doucement (171).

Immunité cellulaire

Plusieurs études ont montré l'induction d'une population cellulaire T régulatrice sécrétrice d'IL-10 et spécifique de l'antigène au cours de l'ITA mais il n'a pas été clairement établi que

la détection de cette population pourrait être utile dans l'étude de l'efficacité de l'ITA en clinique (64,149,172–175).

Parallèlement, le TGF- β a été identifié comme une cytokine clé dans l'efficacité de l'ITA qui augmenterait les cellules T productrices de TGF- β circulantes selon différentes études (145,152,176). Une étude a également décrit une corrélation entre le taux sérique de TGF- β et l'amélioration clinique au cours de l'ITA (177). Cependant, jusqu'à ce jour, il n'a pas été possible d'établir fermement un lien entre ce marqueur et l'efficacité de l'ITA.

La détection d'une modification du nombre ou de la nature des cellules T spécifiques d'antigène pourrait être une voie. L'utilisation de tétramères a été testée pour détecter des cellules T CD4⁺ spécifiques de Bet v1 dans l'allergie au bouleau. Cependant ces tétramères sont restreints au CMH de l'individu, ce qui en limite par définition l'utilisation (171).

Inflammation

Il a été rapporté une diminution des éosinophiles et de l'eosinophil cationic protein (ECP) au sein de la muqueuse nasale suite à une ITA efficace mais le taux sérique de ces marqueurs n'était pas informatif. En ce qui concerne les marqueurs d'activation des éosinophiles, le taux de leukotriènes ne change pas, selon les études qui l'ont évalué (178–181). Une réduction du monoxyde d'azote exhalé (FENO) a été observée au tout début d'une ITA sous-cutanée, lors de la phase d'ascension des doses uniquement (182). Malheureusement, cet examen n'est pas spécifique. Une réduction de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM1) a été décrite après une ITA sub-linguale efficace (183,184).

4. L'ALLERGIE RESPIRATOIRE : EXEMPLE DE L'ALLERGIE AUX ACARIENS

L'asthme est une maladie inflammatoire des poumons caractérisée par un syndrome obstructif réversible, une hyperréactivité bronchique, une infiltration d'éosinophiles et de cellules CD4⁺ Th2 (productrices d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et de TNF α) dans la sous-muqueuse, une hypersécrétion de mucus et un remodelage des voies aériennes. L'asthme peut être d'origine allergique ou non. Cinquante à 85% des asthmatiques sont allergiques aux acariens, les variations dépendant des zones géographiques (185,186).

4.1. L'allergie aux acariens

Les acariens font partie de la famille des arachnides (qui comprennent également les scorpions, les tiques et les araignées) qui se différencient des insectes par leur nombre de pattes (4 paires et 3 paires chez les insectes) et l'absence d'antennes. Il existe plus de 50 000 espèces d'acariens identifiées. Les acariens les plus fréquemment en cause dans l'allergie sont *Dermatophagoides pteronyssinus* et *Dermatophagoides farinae* dont les allergènes majeurs sont Der p et Der f respectivement. Les allergènes sont retrouvés au niveau des fèces des acariens. Ils appartiennent à différentes familles de protéines (187).

4.2. Physiopathologie de l'asthme allergique aux acariens

Certains allergènes, comme Der p 1, un des allergènes majeurs de *Dermatophagoides pteronyssinus*, peuvent modifier les fonctions de la barrière épithéliale de la muqueuse respiratoire et activer les cellules de l'épithélium, les cellules de l'immunité innée et celles de l'immunité adaptative. Le processus de sensibilisation allergénique, à l'origine du

développement de l'asthme, est induit par un dialogue entre l'immunité innée et l'immunité adaptative au centre duquel la CD joue un rôle important (188).

4.2.1. Reconnaissance des allergènes par l'épithélium respiratoire

Les CD pulmonaires et les cellules épithéliales pulmonaires expriment toutes les deux des PRR pour « pattern recognition receptors » et peuvent être directement activées par les allergènes. Les CD tendent leurs dendrites entre les cellules épithéliales pour rejoindre la surface de l'épithélium. La présence de jonctions serrées entre les deux types de cellules permet de maintenir l'imperméabilité de la barrière vis-à-vis de la lumière des voies respiratoires.

Les allergènes, de leur côté, expriment des PAMPs pour « pathogen associated molecular patterns » qui peuvent activer les différents PRR comme les TLR, les « nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors » et les « C-type lectin receptors ». Par exemple, les acariens activent la voie TLR4/MyD88 par l'intermédiaire de l'allergène Der p 2, ce qui déclenche une réponse Th2. Ils peuvent aussi activer la voie TLR2/MyD88 par les chitines.

La pénétration des allergènes peut être facilitée par une rupture de la barrière épithéliale : de nombreux allergènes ont une activité enzymatique sérine ou cystéine protéase (comme Der p 1) qui leur permet de rompre les jonctions serrées formées par des protéines de la famille des occludines, des claudines ainsi que des zonula occludens 1 (ZO1). Ainsi, Les protéases des acariens, rompent les jonctions serrées présentes entre les cellules épithéliales et permettent l'accès aux CD sous-jacentes. Certains agents environnementaux comme la cigarette ou l'ozone peuvent faciliter la sensibilisation allergénique Th2 : Der p 1 agit en synergie avec la fumée de cigarette pour diminuer la fonction de barrière de l'épithélium respiratoire et activer des cascades de signalisation intracellulaire.

Comme nous l'avons décrit, physiologiquement, l'inhalation d'allergènes induit un phénomène de tolérance. L'activation des CD pulmonaires peut induire une rupture de tolérance et entraîner le développement de cellules Th2. Les CD conventionnelles expriment de nombreux PRR. L'activation de TLR4 par de faibles doses de lipopolysaccharides (LPS) (qui contaminent une grande partie des allergènes inhalés) induit une rupture de tolérance et le développement de cellules Th2 par un mécanisme dépendant de MyD88. En effet, la mesure du taux de LPS dans les matelas est inversement corrélée à l'apparition du rhume des foins, d'une sensibilisation vis-à-vis des allergènes et d'un asthme atopique. Une dose élevée de LPS induit plutôt une réaction Th1 ou Treg alors qu'une faible dose induit plutôt une réaction Th2. La réponse dépend aussi du polymorphisme des PRR (TLR2, CD14, NOD1) : il a été montré que grandir dans une ferme (c'est-à-dire un environnement riche en ligands microbiens) a un effet protecteur sur la survenue de l'asthme de l'enfant uniquement si l'enfant a un certain polymorphisme de NOD1 (189).

Une fois l'allergène fixé sur la CD, cette cellule migre jusqu'aux ganglions médiastinaux drainants selon un mécanisme dépendant de CCR7 et CCR8 afin de permettre la génération de cellules Th2.

Au total, il y a donc deux étapes : la CD doit capter l'allergène puis la CD doit être activée pour induire la génération de cellules Th2 (figure 9). L'activation de la CD se fait par l'intermédiaire de faibles doses d'agonistes TLR (LPS) ou par la présence d'une activité protéolytique intrinsèque à l'allergène.

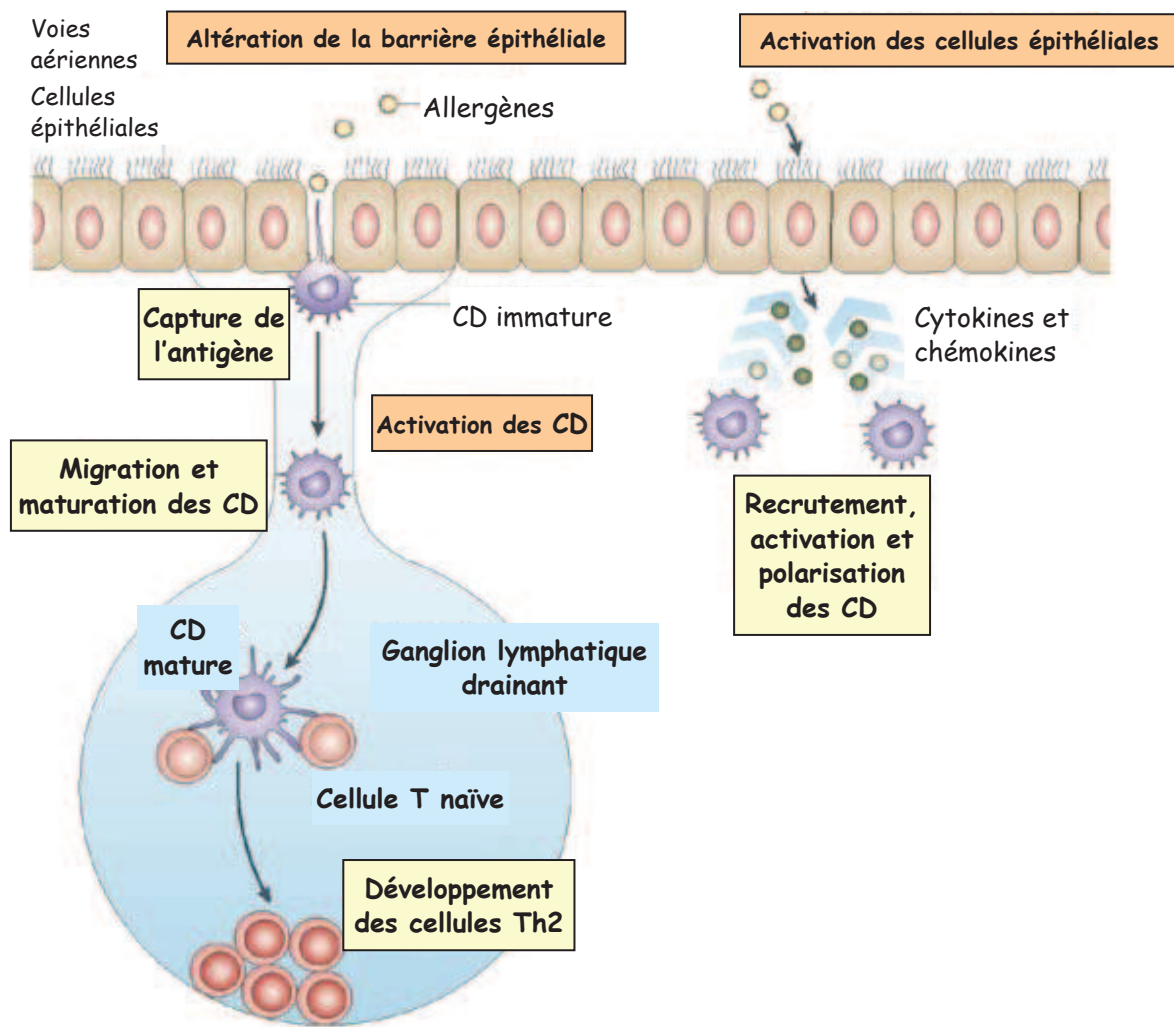


Figure 9. Sensibilisation des cellules Th2 par l'intermédiaire des voies respiratoires.

Adapté de Hammad, Nat Rev Immunol, 2008

4.2.2. Interactions entre les cellules épithéliales et les cellules dendritiques

Les cellules épithéliales qui expriment des PRR (TLR et PAR1-4 pour « protease activated receptor ») peuvent reconnaître des particules microbiennes et des allergènes. Leur interaction induit la production de chémokines capables d'attirer les CD (ainsi que les PNN et les monocytes) et d'induire leur maturation afin de développer une réponse Th2. En réponse aux

allergènes inhalés, les cellules épithéliales sécrètent différentes cytokines (GM-CSF, TSLP, IL-25, IL-33, IL-1) permettant la maturation des CD en favorisant leur capacité à polariser les lymphocytes vers un versant Th2 (190). CCR2 est le récepteur prédominant sur les CD pour attirer les cellules Th2 et son ligand est CCL20.

Le TSLP

Le TSLP se fixe sur les CD au niveau d'un complexe composé du récepteur du TSLP (TSLPR) et de la chaîne α du récepteur de l'IL-7 (IL-7R α). Le TSLP produit par les cellules épithéliales pulmonaires semble avoir un rôle majeur dans l'initialisation de la réponse allergique. Chez l'homme, il est décrit une association entre des polymorphismes du gène de l'IL-7R α et le risque de développer une sensibilisation allergénique ainsi que des polymorphismes au niveau du gène du TSLP lui-même et de son promoteur et les maladies respiratoires allergiques (191). Le TSLP active les CD qui vont à leur tour sensibiliser les cellules T CD4⁺ pour produire les cytokines IL-4, IL-5, IL-13 et TNF. La molécule OX40L intervient dans l'interaction entre la CD et les cellules CD4⁺ naïves. La polarisation Th2 des cellules T CD4⁺ est ensuite augmentée par l'IL-25. Par ailleurs, le TSLP peut aussi activer les mastocytes de façon indépendante.

Le GM-CSF

Le GM-CSF agit également sur la maturation des CD. Il est produit par les cellules épithéliales en réponse à une exposition à un allergène protéolytique comme Der p 1 qui agit sur PAR 2.

Le TNF et l'IL-1

Ces deux cytokines agissent en synergie avec le TSLP sur les mastocytes afin d'induire la production de cytokines Th2.

5. CAS PARTICULIER DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE

5.1. Epidémiologie

Au cours des deux dernières décennies, la fréquence des allergies alimentaires a nettement augmenté, surtout chez l'enfant, avec une plus long délais avant la guérison naturelle (192,193). La prévalence de l'allergie alimentaire varie entre 1% et 10.8% en fonction des études : les facteurs intervenant dans ces variations sont l'âge et les zones géographiques (194). Une étude récente a montré une augmentation de l'allergie alimentaire de 18% chez l'enfant en 10 ans avec une prévalence actuelle de 3.9% aux Etats-Unis (195). On estime que l'allergie alimentaire y est responsable de 125 000 visites annuelles aux urgences, dont 53 700 pour l'anaphylaxie (196,197). Chez l'enfant, l'allergie alimentaire la plus fréquente est l'allergie aux protéines de lait de vache (APLV) (2.5%) suivie de l'allergie aux œufs (1.5%) et de l'allergie à l'arachide (1%) (194,198,199). L'étude des populations migrantes laisse supposer que l'environnement joue un rôle important dans l'augmentation de la prévalence de l'allergie alimentaire. En effet, l'étude menée sur une même population juive établie en Israël ou au Royaume-Unis, montre que la prévalence de l'allergie à l'arachide est de 0.17% dans le premier cas et de 1.85% dans le deuxième, soit 10 fois plus. En Israël, la consommation d'arachide entre 8 et 14 mois était estimée à 7.1g dans ce travail, alors qu'elle était nulle au Royaume-Unis (74). Par ailleurs, dans une deuxième publication, le même groupe a montré que l'allergie à l'arachide était associée à la consommation en arachide de l'ensemble de la maison mais pas à celle de la mère pendant la grossesse (200). De nombreux autres facteurs sont supposés intervenir dans cette augmentation comme l'alimentation (la vitamine D, la vitamine A, certains nutriments, les graisses), l'utilisation d'anti-acides qui diminue la dégradation des protéines, ou encore le retard à l'introduction de certains produits dans

l'alimentation, favorisant un premier contact cutané ou respiratoire (plutôt sensibilisant) et non oral (plutôt tolérogène) avec l'allergène (201,202).

L'allergie alimentaire est responsable de symptômes très variables allant de légères démangeaisons à l'anaphylaxie mortelle ; le décès par anaphylaxie, le risque ultime de l'allergie alimentaire, est toujours d'actualité (203–205). À ce jour, le traitement de l'allergie alimentaire est basé sur la stricte éviction de l'allergène et l'administration d'adrénaline auto-injectable. Mais cette prise en charge n'améliore que partiellement la qualité de vie du patient, avec la crainte perpétuelle de l'anaphylaxie en raison du risque potentiel d'ingestion accidentelle de l'allergène caché dans les aliments (206–208). Des études ont rapporté que l'ingestion accidentelle d'allergènes peut se produire dans 40 à 75% des patients, même ceux qui observent une exclusion stricte, ce qui explique l'inquiétude des patients et de leurs familles et la nécessité de mettre en œuvre d'autres modalités thérapeutiques comme l'ITA qui est en cours d'étude dans l'allergie alimentaire.

Seule l'allergie alimentaire IgE-médiée sera abordée par la suite.

5.2. La tolérance orale

La tolérance orale est le mécanisme par lequel l'absorption orale d'un antigène n'induit pas de réponse immunitaire même s'il est, par la suite, administré de façon systémique (26,209). Les mécanismes de développement de l'allergie alimentaire ne sont pas encore entièrement compris . Chez les individus ayant une prédisposition, la tolérance orale n'est pas acquise et l'exposition allergénique par d'autres voies non tolérogènes (respiratoire ou cutanées) peut engendrer une sensibilisation (202). L'hypersensibilité assurée par les IgE est induite par une réponse Th2 spécifique d'antigène et produisant les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 comme il a

été montré dans l'allergie à l'arachide (210,211) et l'allergie au lait (212–214) chez l'homme.

5.2.1. Tolérance immunitaire et muqueuse gastro-intestinale

Le tractus gastro-intestinal représente la plus grande surface de l'organisme et constitue une barrière entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur stérile. Sa surface épithéliale est en constante interaction avec le milieu extérieur. Cette barrière, dont le rôle est d'empêcher la pénétration d'agents pathogènes, est constituée de 2 parties, l'une anatomique et l'autre immunologique (201). Avec le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT), c'est l'organe lymphoïde le plus conséquent de l'organisme. Il permet d'éviter le développement de réponses immunitaires vis-à-vis des protéines de l'alimentation et des bactéries commensales afin de pouvoir remplir sa fonction première d'absorption des nutriments. Malgré cette barrière intestinale, 2% des antigènes alimentaires franchissent la muqueuse gastro-intestinale.

Sur le plan anatomique, une monocouche de cellules épithéliales jointes par des jonctions serrées est recouverte d'une épaisse couche de mucus. Les enzymes intestinales, les sels biliaires et les différences de pH contribuent également à détruire les agents pathogènes et rendre les protéines moins immunogènes.

Concernant le système immunitaire de la muqueuse gastro-intestinale, il comprend des composants de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles, macrophages, cellules natural killer (NK), cellules épithéliales et TLR) et des composants de l'immunité adaptative (lymphocytes intra-épithéliaux et de la lamina propria, plaques de Peyer, IgA sécrétoires, cytokines). L'exclusion de l'antigène à l'aide d'anticorps sécrétoires IgA et IgM module ou inhibe la colonisation de l'hôte par les microorganismes et la pénétration d'antigènes solubles dangereux.

Réponse immunitaire physiologique

Les protéines de l'alimentation ont un rôle important dans la stimulation de la maturation du système immunitaire (215). Lors de la digestion, les acides gastriques et les enzymes de la lumière intestinale détruisent les épitopes conformationnels et permettent de réduire l'immunogénicité des protéines. Les antigènes alimentaires sont pris en charge par les cellules dendritiques, les cellules-M (pour « microfold cell ») et certaines cellules épithéliales. Les CD présentent les antigènes alimentaires au GALT sous-jacent alors que les cellules-M sont à l'origine d'un processus permettant l'activation des Treg. Les cellules épithéliales peuvent également avoir un rôle de cellules présentatrices d'antigène et présenter celui-ci à des cellules T sensibilisées spécifiques mais l'absence de « second signal » mène à l'induction d'une anergie. (Figure 10)

Rôle des CD dans la tolérance orale

Les CD de la muqueuse gastro-intestinale sont nécessaires à l'induction de tolérance vis-à-vis d'un antigène administré oralement. Il existe différents types de CD dans le tractus gastro-intestinal et tous semblent avoir un rôle dans l'induction de la tolérance orale. Ces cellules sont localisées dans la lamina propria des villosités intestinales, dans les ganglions mésentériques et dans les plaques de Peyer. Les CD les plus impliquées dans la tolérance orale sont celles de la lamina propria qui est drainée par les ganglions mésentériques. Il existe à cet endroit 2 types de CD : les CD exprimant CXCR3 (le récepteur de la fractalkine) et les CD exprimant CD103 (l' α E intégrine). Le nombre et la proportion des différents types de CD dépend en particulier du microbiote : en effet, elles sont en nombre très réduit dans les souris axéniques ou « germ free » (216).

Fonctionnellement, ces deux types de cellules sont très différents. Les cellules CX3CR1⁺ induisent plutôt les cellules Th17 en réponse à un agent microbien. Les CD103⁺ expriment

IDO et induisent le développement de Treg par un mécanisme dépendant du TGF- β et de l'acide rétinoïque chez la souris et chez l'humain. IDO est impliqué dans la réduction de la prolifération des cellules T et active la différenciation des cellules Treg. Chez la souris, son inactivation empêche le développement de la tolérance orale (217). La nature des antigènes oriente vers le développement de différents types de cellules Treg en fonction de leur récepteur sur les CD. Ainsi, les protéines mannosilées induisent préférentiellement des Tr1 alors que les non- mannosilées induisent plutôt des Treg Foxp3⁺.

Rôle des cellules Treg dans la tolérance orale

Les Treg semblent avoir un rôle important dans le maintien et l'induction de la tolérance orale. Chez l'homme, un défaut en Treg est associé au développement d'allergies alimentaire alors qu'une augmentation des Treg serait plutôt associée à une diminution de la réactivité clinique (215). Comme nous l'avons déjà décrit, des mutations du facteur de transcription Foxp3 sont associées au syndrome IPEX. Dans ce syndrome, le déficit immunitaire profond est associé à une endocrinopathie, une entéropathie sévère et à des allergies alimentaires (40). Un phénotype moins sévère associe également une entéropathie, des allergies alimentaires et une DA sans endocrinopathie associée.

Chez l'enfant, la guérison de l'allergie au lait est associée un taux plus élevé de Treg CD4⁺CD25⁺ circulants (218). Par ailleurs ceux qui consomment du lait bouilli sans réaction ont une fréquence de cellules Treg spécifiques d'allergènes plus élevée que les enfants qui y réagissent (219). De la même façon, il a été observé une augmentation des Treg Foxp3⁺ spécifiques d'allergène chez les enfants pouvant ingérer de la cacahuète sans réaction après un protocole d'induction de tolérance à l'arachide (220).

Plusieurs populations de cellules T régulatrices ont été identifiées au niveau de l'intestin : les cellules Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, les Tr1 sécrétrices d'IL-10, les cellules $CD4^+$ sécrétant du TGF- β dites Th3, les cellules T $CD8^+$ suppressives et les cellules T $\gamma\delta$ (221).

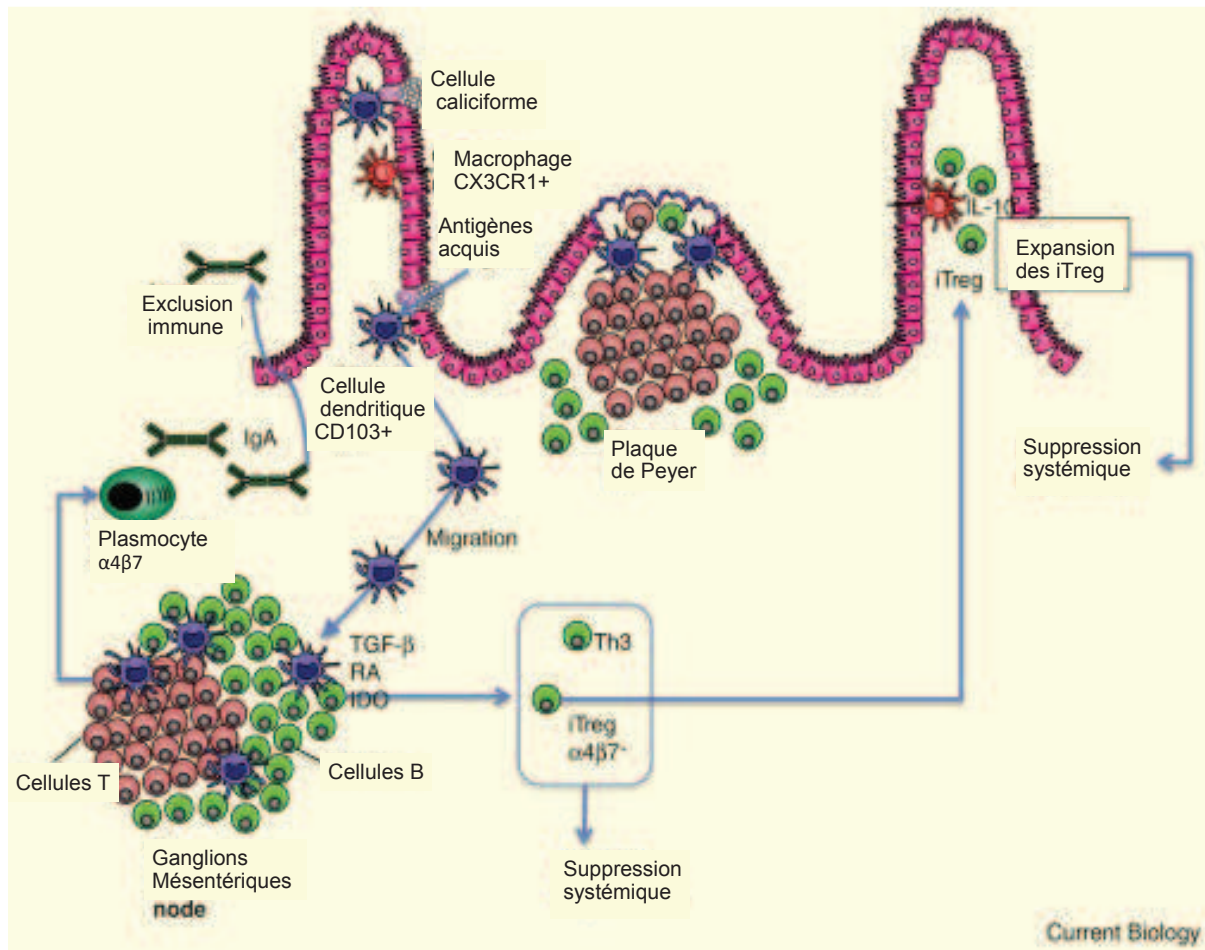


Figure 10. Mécanismes d'induction de la tolérance orale. Adapté de Berin C et al, Curr biol, 2013

5.2.2. Facteurs favorisant la sensibilisation aux aliments

Le dysfonctionnement de la barrière épithéliale semble contribuer au développement d'une sensibilisation aux allergènes alimentaires ainsi qu'au développement des réactions d'anaphylaxie faisant intervenir les IgE. Chez les patients présentant une allergie alimentaire,

une augmentation de la perméabilité intestinale initiale serait à l'origine d'un passage accru d'antigènes alimentaires. L'efficacité de la barrière intestinale n'est pas parfaite chez le nourrisson et le jeune enfant en raison d'une immaturité : en particulier, l'activité de certaines enzymes n'est pas optimale chez le nouveau-né et le système des IgA sécrétoires est immature avant l'âge de 4 ans. Il a été démontré qu'un déséquilibre de la perméabilité de la barrière intestinale était à l'origine d'une sensibilisation vis-à-vis d'allergènes alimentaires et notamment chez l'enfant du fait de cette immaturité (222).

Un facteur environnemental majeur impliqué dans le développement de l'allergie alimentaire est le microbiote. Toute la surface du corps humain est peuplée de microorganismes divers et la plus grande densité est retrouvée au niveau du tractus gastro-intestinal inférieur avec une densité $>10^{12}$ organismes/cm³ (223). L'étude de souris axéniques ou « germ free » a montré que certaines bactéries étaient associées à des maladies inflammatoires de l'intestin alors que d'autres avait un rôle protecteur (224). Ces souris, tout comme les souris traitée par antibiotiques ont une susceptibilité accrue à développer des sensibilisations alimentaires. Le traitement de souris par antibiotiques ou l'absence de TLR 4 (qui reconnaît les LPS bactériens) développent plus facilement une allergie à l'arachide que les souris contrôles lorsqu'elles sont soumises à un protocole de sensibilisation à l'arachide (225). Le microbiote interagit avec le système immunitaire et a un impact sur le développement des lymphocytes, de la fonction épithéliale et de l'immunité innée (223). Il a été aussi décrit que le microbiote peut induire une suppression de la production des IgE et du développement des basophiles. La flore digestive commensale a donc un rôle tolérogène (226,227). Chez l'homme, il semblerait que les individus présentant des allergies alimentaires auraient une dysbiose, c'est-à-dire un déséquilibre au niveau des espèces bactériennes présentes au niveau du tube digestif mais les études à grande échelle font encore défaut à ce jour (228). Dans ce cadre, l'administration de

probiotiques pourrait prévenir le développement de l'allergie alimentaire mais les résultats restent contradictoires à ce jour (229,230).

La vitamine D est connue pour avoir certains effets immunomodulateurs et un déficit en vitamine D a été associé au développement de sensibilisations à certains aliments. La vitamine A semble aussi avoir un rôle immunorégulateur mais les observations sont discordantes (231).

Enfin, les voies d'exposition allergéniques autres que la voie orale ont pour caractéristique d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th2 alors que la voie orale est tolérogène. Le syndrome oral (sensibilisation à un aliment suite à une sensibilisation à un pneumallergène) est un exemple de sensibilisation respiratoire (232,233). Dans cette situation, la sensibilisation à un pneumallergène (comme la protéine Bet v 1 du bouleau par exemple) engendre des symptômes cliniques mineurs de type prurit et œdème péribuccal à l'ingestion de certains fruits crus (comme la pomme, en raisons d'une réactivité croisée entre Bet v 1 et Mal d 1, un allergène mineur de la pomme, thermosensible). Par ailleurs, une lésion de la barrière cutanée (comme dans la DA sévère) est aussi une porte d'entrée à une sensibilisation cutanée. Comme nous l'avons déjà décrit, la sensibilisation à l'arachide par la voie cutanée serait à l'origine du développement d'une allergie chez les enfants chez qui l'introduction orale de l'arachide est tardive.

5.3. Diagnostic biologique de l'allergie alimentaire

Actuellement, la seule façon de diagnostiquer une allergie alimentaire avec certitude, est le test de provocation orale (TPO) qui est laborieux et qui n'est pas exempt de risques. Le TPO détermine si un sujet réagit à l'ingestion d'un aliment spécifique et à quelle dose il réagit.

Il n'existe actuellement aucun marqueur biologique en mesure de confirmer avec certitude la présence ou l'absence d'une allergie alimentaire ou de prédire la guérison ou affirmer que la tolérance a été induite chez un individu (234).

La réalisation de tests cutanés d'allergie (TCA) permet d'éliminer une allergie IgE médiée (valeur prédictive négative >90%) mais n'atteste pas que l'aliment est forcément en cause dans l'allergie (spécificité <100%). Elle permet, en réalité, de détecter une sensibilisation (235). La taille de la papule des TCA a été associée à la persistance de l'APLV (236,237) et à l'allergie à l'arachide (238).

En pratique clinique, la détection du taux sérique d'IgE spécifiques vient confirmer le résultat des TCA. Plus le taux est élevé, plus le risque de développer une réaction à l'allergène est important mais il n'y a pas de corrélation avec la sévérité de la réaction. La présence d'IgE spécifiques n'implique pas forcément une allergie à l'allergène suspecté et inversement, l'absence d'IgE spécifiques n'exclue pas totalement une allergie (239–246). L'étude d'IgE spécifiques d'épitopes d'allergènes pourraient permettre d'affiner le diagnostic dans l'allergie alimentaire (247,248).

La recherche de cellules T spécifiques d'allergène a été réalisée en utilisant des tétramères de classe II. Dans l'allergie à l'arachide, ces tétramères reconnaissaient Ara h1, un allergène majeur de l'arachide (129).

En ce qui concerne les tests fonctionnels, il a récemment été montré que l'activation des basophiles était plus élevée chez les patients ayant une allergie au lait plus sévère (249–251).

OBJECTIF

L'objectif de ce travail était d'établir l'intérêt de l'étude *ex vivo* des cellules T circulantes dans l'allergie de l'enfant.

Nous nous sommes intéressés à l'allergie aux acariens et à l'allergie au lait de vache, deux allergies très fréquentes chez l'enfant.

D'une part nous avons évalué l'apport de l'analyse des cellules Th2 spécifiques d'allergène dans le diagnostic de l'allergie par rapport au dosage des IgE spécifiques, reflet de la sensibilisation à l'allergène.

D'autre part, nous avons étudié l'intérêt du suivi des cellules Th2 et Tr1 au cours de la désensibilisation aux acariens par voie sublinguale et par voie sous-cutanée. Ici, le but était d'une part d'essayer d'identifier comme un marqueur d'efficacité du traitement la caractérisation *ex vivo* des cellules T spécifiques d'allergène et d'autre part d'approfondir la compréhension de l'induction des mécanismes de tolérance immunitaire au cours de la désensibilisation.

RESULTATS

ARTICLE 1 : Quantification of circulating house dust mite-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells correlates with rhinitis severity in asthmatic children and varies with the seasons.

(article soumis)

B MICHAUD MD^{1,2}, R GOUVIS-ECHRAGHI MD³, S CANDON MD PhD^{1,2}, R COUDERC PhD PharmaD⁴, JP JAIS^{5,2}, JF BACH MD PhD^{1,2}, L CHATENOU D MD PhD^{1,2}, J JUST MD PhD³,

¹ Institut national de la santé et de la recherche médicale, Unité 1013, PARIS, France

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France

³ Groupe hospitalier Trousseau-la Roche Guyon, Université Pierre et Marie Curie, Centre de l'Asthme et des Allergies, Paris, France

⁴ Groupe hospitalier Trousseau-la Roche Guyon, Université Pierre et Marie Curie, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Paris, France

⁵ Biostatistique et Informatique Médicale, Hôpital Necker Enfants Malades,

Address for correspondence

Lucienne Chatenoud, MD,PhD: INSERM U1013, Hôpital Necker Enfants-malades, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris

Tel : +33 1 44 49 53 73

Fax : +33 1 43 06 23 88

E-mail: lucienne.chatenoud@inserm.fr

Jocelyne Just, MD, PhD

Hôpital Trousseau, 26 avenue du Dr Arnold Netter 75012 PARIS

Tel : + 33 1 71 73 83 02

Fax : + 33 1 44 73 66 35

E-mail : jocelyne.just@trs.aphp.fr

INTRODUCTION

L'allergie aux acariens est l'allergie perannuelle la plus fréquente chez l'enfant en Europe du Nord. Elle est à l'origine de symptômes de gravité variable allant de la rhinoconjonctivite simple à l'asthme sévère. Le traitement étiologique est l'immunothérapie spécifique d'allergène. Elle permet une amélioration voire une rémission des symptômes et une diminution notable des traitements symptomatiques. Son effet est durable à l'arrêt du traitement et elle diminue le risque de développer de nouvelles sensibilisations. Le diagnostic précis de l'allergie et de l'allergène en cause est indispensable avant de débiter une désensibilisation. Actuellement, le test clinique de référence (« gold standard ») pour le diagnostic est le test de provocation spécifique (nasal ou bronchique). Il est réservé aux études cliniques du fait des contraintes techniques. Actuellement, le diagnostic nécessite également l'association d'une positivité des tests cutanés allergologiques (TCA) et une augmentation des IgE spécifiques circulantes. Ces examens s'ils sont bien le reflet de la sensibilisation biologique du patient ne sont pas pour autant en relation avec la symptomatologie présentée. L'étude des mécanismes immunologiques impliqués dans la réaction allergique a montré que les lymphocytes Th2 sécréteurs d'IL-4, IL-13 et IL-5 avaient une place importante dans la physiopathologie de la maladie. En effet, il a été montré que les cellules Th2 circulantes spécifiques d'allergène sont plus nombreuses chez les sujets sensibilisés que les sujets sains.

Nous avons étudié la réponse lymphocytaire T dans une population d'enfants asthmatiques allergiques aux acariens. Nous avons pu montrer que l'utilisation de l'ELISpot permettait en culture cellulaire courte (18h) d'évaluer le nombre de cellules Th2 circulantes sécrétrices d'IL-4 et d'IL-13 et spécifiques d'acariens chez ces enfants. Ces cellules sont absentes chez les patients sains non sensibilisés aux acariens et elles sont plus nombreuses chez les enfants ayant une rhinite allergique sévère comparés à ceux ayant une symptomatologie plus

modérée. Par ailleurs, leur nombre varie en fonction des saisons avec un pic au printemps et un pic en automne.

ABSTRACT

Background: Defining suitable markers to diagnose and monitor allergy and its severity is essential to correctly assign patients for specific immunotherapy. Circulating levels of specific IgE are good markers of sensitization but not of clinically symptomatic allergy.

Objective: Quantify circulating Interleukine (IL)-4 and IL-13-secreting T-cells specific for house dust mite (HDM) in children presenting HDM allergic asthma associated or not with rhinitis and correlate results with clinical symptoms.

Methods: We analyzed 26 children with HDM respiratory disease (allergic rhinitis and asthma) together with 6 children with non-allergic asthma. Peripheral blood mononuclear cells were stimulated with HDM extract in a 24 hours ELISpot assay to quantify the number of HDM-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells. Asthma severity and control, and rhinitis severity were scored according to the Global Initiative for Asthma (GINA) and the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Guidelines.

Results: The number of HDM-specific IL-4 and IL-13-secreting T-cells were higher in patients with allergic asthma as compared to patients with non-allergic asthma. It varied with the season of blood sampling with two peaks in the fall and early spring. Independently of the season, the number of HDM-specific IL-4 secreting T-cells correlated with rhinitis severity (OR=2; 95% IC:1.1-3.8; p=0.04).

Conclusions & Clinical relevance: Allergen-specific IL-4 and IL-13-producing T-cells were only detected in HDM allergic asthmatic children (not in patients with non-allergic asthma). Their numbers correlated with clinical severity of allergic rhinitis. Pending further validation, these results suggest that this sensitive method could represent a valuable marker to monitor HDM allergy and aid in the management of immunotherapy interventions.

Abbreviations used

ARIA: Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma

ACT: Asthma Control Test

ELISpot: Enzyme-Linked ImmunoSpot

GINA: Global Initiative for Asthma

HLA: human leucocyte antigen

HDM: house dust mite

IL- : interleukine-

IgE: immunoglobuline

ICS: inhaled corticosteroids

IFN- γ : interferon γ

PHA: phytohemagglutinin

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

TH2 cells: type 2 helper t-cells

INTRODUCTION

The prevalence of allergic diseases is steadily increasing worldwide and represents a significant public health problem especially in industrialized countries (1). In European countries among the inhaled allergens, house dust mite (HDM) is the most common per annual allergen responsible for symptomatic manifestations of allergy ranging from allergic rhinitis to severe asthma (4). Specific allergen immunotherapy is the only specific treatment which provides a real cure for the disease (5). This specific treatment of allergy, also allows the improvement of a pre-existent asthma and prevents the development of new sensitizations (7).

Allergic polysensitization is a frequent phenotype of allergic asthma (8). Hence, the importance of identifying the major allergen responsible for the symptoms before starting specific allergen immunotherapy is a major issue. In this situation, defining suitable and easy-handling antigen-specific T cell biomarkers would therefore considerably improve patients' management and targeted treatment such as specific allergen immunotherapy.

In fact, currently, the bronchial provocation test and nasal provocation test are the gold standards for diagnosis of mite allergy. However these are invasive tests, presenting well known risks that must be carried out in a specialized environment. Among immunological tests routinely used is the determination of specific immunoglobulin E (IgE) that reflects the sensitization to an allergen but is not satisfactory for the diagnosis of mite allergy. In addition, the recently developed basophil activation test is a functional readout which, in terms of diagnosis, has not yet proved to be superior in the diagnosis of mite allergy compared to the dosage of specific IgE (9,10). Type 2 helper T lymphocytes (Th2) play a central role in orchestrating the inflammatory response in allergy through their secretion of interleukin (IL)-4 and IL-13 mediating B cell stimulation and IgE synthesis (11).

The Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot) assay is a sensitive tool for enumerating cells producing a given cytokine following stimulation with an antigen or a mitogen. The ELISpot assay was described long ago initially for the detection of interferon (IFN) γ production at the single cell level (13). The reliability of the IFN γ ELISpot in quantifying antigen specific T cells has been validated by several laboratories including ours, in the monitoring of a wide variety of indications, including patients with infectious (14), autoimmune and neoplastic diseases undergoing immunotherapeutic treatments.

The advantages of the ELISpot assay are the capacity to identify antigen-specific cells producing a given cytokine, to do this at the single cell level therefore allowing the quantification of responding cells and, last but not least, to measure responses following a short-term in vitro culture. Indeed, it has been demonstrated that such short-term stimulation allows the detection of already differentiated antigen-specific cells including the in vivo activated effector and/or memory T cell pool. Therefore, the measured response visualizes the in vivo cellular number of circulating differentiated antigen-specific T cells in an individual. In this study, we enumerated the number of HDM-specific IL-4 and IL-13-producing T lymphocytes in a series of consecutive clinically well characterized asthmatic children presenting varying degrees of allergic rhinitis.

METHODS

Patient population

The patients we analyzed were part of the 2 years (2011-2012) Trousseau Asthma Program at the Hôpital Trousseau in Paris.

Inclusion criteria for the allergic group were: 1) age higher than 5 years, 2) diagnosis of active asthma (defined as a history of recurrent wheeze or more than 3 episodes of reversible bronchial obstruction documented within the previous 6 months), 3) absence of other chronic obstructive pulmonary diseases (congenital or acquired), 4) Allergic rhinitis, assessed using the questionnaire from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)⁸ and rhinitis severity was determined according to the World Health Organization (WHO) ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) Guidelines, based on the impact of rhinitis upon patient quality of life (17) 5) presence of allergic sensitization to HDM [defined as positive skin prick test (wheal ≥ 3 mm compared to negative control) and specific IgE ≥ 0.35 kU/L against *Dermatophagoides pteronyssinus*] in absence of sensitization to perannual allergens (mould, cockroach, cat and dog) and of clinical symptoms of seasonal allergy (birch and grass pollen), 5) the achievement of clinical examination outside of episodes of exacerbation or acute respiratory illness before initiation of specific immunotherapy 6) and finally having no previous specific immunotherapy.

Inclusion criteria for the non-allergic group: patients presenting non-allergic asthma who featured the same clinical characteristics of the allergic group except that they didn't have any symptoms of allergic rhinitis and they did not present any allergic sensitization to HDM [skin prick test and specific IgE towards *Dermatophagoides pteronyssinus*].

Asthma was defined as intermittent, mild persistent, moderate persistent, or severe persistent according to the Global Initiative for Asthma (GINA) 2005 (18). All enrolled children were

treated with fixed dose of inhaled corticosteroids (ICS) for at least 6 months and were compliant with their prescribed treatment. High doses of ICS were defined as 500 µg or more of fluticasone (or its equivalent) per day. The control of asthma was assessed according to GINA 2009 and to Asthma Control Test (ACT) (19). The outcome of treatment was ranked as: controlled with or without high-dose ICS, or uncontrolled (including partially controlled) with or without high-dose of ICS.

The study protocol was approved by the Paris 5 ethics committee and all patients gave written informed consent.

ELISpot assay.

Blood samples were collected in citrate phosphate dextrose adenine (CPDA)-pretreated blood collection tubes. They were stored at room temperature and processed within 24 hours following collection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation. Ninety-six well PVDF (Millipore) plates were permeabilized for 1 minute using 35% ethanol, washed five times with PBS and coated overnight at 4° C with antibodies to interleukine (IL)-4 or IL-13 following the manufacturer's instructions (U-Cytech, Utrecht, The Netherlands). Then, the plates were incubated for 1 hour at 37°C with blocking solution and washed 3 times with PBS. PBMC were resuspended in culture medium (RPMI 1640 from Invitrogen containing L-glutamin and supplemented with Penicilline, streptomycine and 10% fetal calf serum) and added at 0.3×10^6 per well in triplicates to coated plates together with HDM (from *Dermatophagoides pteronyssinus*) or phytohemagglutinine as positive control (PHA, 10µg/ml, DIFCO) or medium alone as negative control.

HDM extract was obtained from Stallergene, France, at a concentration corresponding to 20µg/ml Derp 1, a major allergen of *Dermatophagoide pteronyssinus*.

After culture for 20 hours at 37°C, the cells were removed by extensive washing, and a secondary antibody to IL-4 or IL-13 (U-Cytech) was added and incubated for 1 hour at 37°C. After extensive washing of both sides of the plate, GABA (phi-labeled anti-biotin antibodies) conjugate (U-Cytech) was added for 1-hour at 37°C. After another series of washings, Activator I+II was added to visualize spots. The reaction was stopped 25 minutes later by washing with water and plates were air-dried for 1 hour before spot counting using an ELISpot reader (Autoimmun Diagnostika, Strassberg, Germany).

All data shown are means of triplicate wells and expressed as spot-forming cells per 0.3×10^6 lymphocytes.

Total and specific IgE levels

Serum levels of total immunoglobulin E (IgE) and specific antibodies (IgE, IgG4) against Dermatophagoide pteronyssinus were determined in whole blood using the immunoCAP-System (Thermo Fischer, Uppsala, Sweden).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software. Intergroup comparisons of continuous variables were performed with the Mann–Whitney U-test and bivariate correlation was analyzed with the Spearman's rank test. A multiple logistic regression analysis was used to assess the strength of the statistical associations in presence of confounding factors, with STATA 12.1 software. Two-sided P-values of <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

1) Patients and Controls characteristics

This was a cross sectional study that included 26 consecutive asthmatic patients who met the inclusion criteria, before undergoing specific immunotherapy to HDM. Twenty-one were boys (80.8%) and mean age was 9.14 (± 2.85) years (mean \pm SD). Most of the children had moderate to severe asthma (n=20, 77%). Patients with intermittent to mild persistent rhinitis and patients with moderate to severe persistent rhinitis were evenly distributed (see Table 1). Most of them were monosensitized to HDM (n=15, 6%). Six patients were included in the non-allergic group; mean age was 9.1 (± 4.3) years. Most of them had severe asthma (n=5, 83%). None had rhinitis.

2) The number of HDM-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells is associated to the presence of HDM respiratory allergy

In a set of preliminary experiments using peripheral blood cells recovered from normal healthy donors we confirmed that the HDM preparation used did not trigger a non-specific IL-4 or IL-13 production by T cells. Phytohemagglutinine (PHA) was used in these and in the further experiments as a positive control showing over 300 spots for 0.3 million PBMC for IL-4 and IL-13.

In patients sensitized to HDM, the number of cytokine producing T cells following HDM stimulation detected by ELISpot ranged from 0 to 85.2 spots over 0.3 million PBMC for IL-4. Half of them had more than 32 spots. It ranged from 0 to 68.7 spots for IL-13. Half of them had more than 33 spots (see Figure 1). As also shown in figure 1, the two responses were highly correlated ($p < 0.0001$, $r = 0.88$). In contrast, in the non-allergic group (including patients presenting with non-allergic asthma), we never detected any HDM specific T-cell response neither for IL-4 nor for IL-13 (see figure 2). The number of HDM-specific IL-4 producing T

cells was 32.15 (11-60.03) (median IQR) in patients as compared to 0 in controls ($p=0.0005$). The number of HDM-specific IL-13 producing T cells was 33.25 (14.9-50.4) in patients as compared to 0 in controls ($p=0.0005$). In both groups, the number of specific T-cells in response to Phytohemagglutinine (PHA) was over 300 spots for 0.3 million PBMC for IL-4 and IL-13.

3) The number of IL-4 and IL-13 secreting HDM-specific T-cells varied with the seasons

17 patients were analyzed between January 2011 and November 2011. During this period of time, we found that the number of IL-4 and IL-13 secreting T-cells in response to HDM significantly varied depending on the season and showed two periods (see figure 3). An intense response was observed during the fall and early spring compared to a significantly milder response during winter and summer ($p = 0.002$ for IL-4 and $p=0.008$ for IL-13). Therefore, for the multivariate analysis, we categorized as season with a high response (the fall and early spring) and season with a low response (winter and summer).

4) The number of HDM-specific IL-4 secreting T-cells correlates with the severity of allergic rhinitis

Allergic rhinitis severity was categorized as intermittent to mild persistent or moderate to severe persistent. As shown in figure 4, we found that the number of IL-4 secreting HDM specific T-cells significantly differed with the severity of rhinitis. Thus, children with moderate to severe persistent rhinitis had a higher number of IL-4 secreting HDM specific T-cells than those presenting intermittent to mild persistent rhinitis ($p=0.04$, see Figure 4). The number of IL-13 secreting HDM specific T-cells also tended to be higher in children with moderate to severe persistent rhinitis than in children with intermittent to mild persistent rhinitis ($p=0.06$, see Figure 4). In a univariate analysis, neither asthma control or severity nor

HDM sensitization (specific IgE) or total IgE was associated with rhinitis severity (see Table 2) (20,21).

We used a logistic regression model. Odd ratios are given for a variation of 10 HDM-specific IL-4 or IL-13 secreting T-cells. Data were adjusted for age and gender as possible confounding factors. Because specific T-cell response varied depending on the season, we also adjusted for season of blood sampling as possible confounding factor. Seasons of blood sampling were categorized as season with high response (the fall and early spring) and season with a low response (winter and summer). Seasons were arbitrarily determined depending on ELISpot responses.

The severity of the rhinitis was determined by the number of IL-4 secreting HDM specific T-cells (OR: 1.46; 95%IC 1.03-2.08; $p=0.04$). This association was also found after adjusting for age, gender or season. The severity of the rhinitis also tended to be associated with the number of IL-13 secreting HDM T-cells (OR=1.5; 95%IC 0.96-2.2; $p=0.07$).

DISCUSSION

With the development of allergen specific immunotherapy and the increasing polysensitizations it has become extremely important to accurately identify the allergen that triggers the clinical symptoms. The biological parameter commonly used to diagnose HDM respiratory allergy is the serum level of specific IgE, that is certainly a good marker for sensitization but not for the clinical symptoms and therefore for allergy. Biological functional tests represent as an interesting alternative. A positive correlation was shown between HDM specific basophil activation and HDM specific IgE levels but a relationship with the clinical symptoms has not yet been demonstrated (9). HDM specific Th2 responses were described to correlate with various aspects of allergic disease (HDM specific IgE, skin prick test positivity, non specific bronchial hyper reactivity) (22–25). Of interest are the data showing that the Th2 response namely, IL-5 secretion by T-cells cultured in presence of HDM correlated with the response to the bronchial provocation test to HDM that is the gold standard for the diagnosis of allergy (26).

Here, we quantitated allergen-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells, using an ELISpot after a short 20 hours in vitro stimulation, in HDM allergic asthmatic children. Our current data demonstrate that with this method it is possible to distinguish HDM allergic asthmatic children from patients presenting with non-allergic asthma. IL-4 and IL-13 responses were significantly correlated; studies are in progress to evaluate the proportion of T cells producing the two cytokines.

It is important to highlight three technical factors that appear crucial to explain the greater specificity of this test compared to those previously described in the literature (22–28). The first is the use of a crude preparation of allergen which, when compared to the use of purified recombinant allergens or their derivate peptides, allows evidencing a response to a larger

number of antigenic determinants and thereby uncovering the response in a larger number of patients. Importantly, in our hands using this crude preparation does not expose to the risk of false positives as no response was detected in the non-allergic group. The second factor is the short in vitro stimulation used (i.e. 20 hours) that can be applied due to the high sensitivity of ELISpot and which improves the final specificity of the read out as it favors the detection of experienced activated and memory T-cells, thereby representing a snapshot of the in vivo existing situation. This has been initially demonstrated in individual after recovery from a viral infection who exhibit low frequency of specific T-cells undetectable by conventional methods without a previous in vitro expansion with cognate antigen which may introduce qualitative and quantitative biases (29). In the particular case of influenza virus because of the high sensitivity of the short-term stimulation ELISpot it was possible to detect circulating CD8⁺ memory T-cells capable of rapid effector function (29).

Third, in terms of read out what the ELISpot provides is a quantification of allergen-specific T-cells as compared to the measurement of cytokine levels in the supernatants of T-cell cultures (30,31). The only other way to track antigen-specific T cells is the use of HLA-peptide-tetramers directed to the allergen-specific T-cell receptors that has been applied in different kind of allergies (peanut, wasp venom, cockroach, dog, pollens allergy) (32–38). Although highly specific the problem of this method is that it may only be applied to the patients exhibiting the HLA molecule for which the tetramer is available. Also the repertoire of the T-cells detected is by definition restricted to the peptides available in the tetramers. Finally, HLA class II tetramers, needed to identify CD4⁺ Th2 cells are quite labor intensive to produce. However it is restricted to HLA and only a few patients can be tested.

The present results also demonstrate that the number of HDM-specific IL-4 or IL-13 secreting T-cells is significantly correlated with the severity of allergic rhinitis in the series of HDM asthmatic children studied. Thus, the level of the allergen specific T-cell response well

reflected a clinically relevant HDM allergy. Indeed, the severity of allergic rhinitis could be inferred by the number of HDM-specific IL-4 secreting T-cells. Interestingly, we found that this result was not influenced by the asthma control or the level of serum HDM specific IgE. To our knowledge, this is the first time that a biological test is associated to a clinically symptomatic allergy independently of an exogenous (biological) sensitization. As the analyses were performed on circulating T-cells the present results also support the notion that, if adequately measured, the functional capacity of lymphoid T cells in the periphery is a good reflect of ongoing processes in situ namely, the immune-mediated allergic inflammatory process in the airway mucosa. This is relevant as no such relationship has been described for circulating versus local levels of specific IgE. Thus, in a series of patients presenting grass pollen allergy, specific IgE in the nasal mucosa showed a better correlation with allergen exposure than serum evaluations (39). Similarly, in HDM allergic children presenting rhinitis and asthma, specific IgE in the nasal mucosa increased significantly during allergen exposure while serum HDM specific IgE did not (40).

Further confirming the specificity of the quantification of circulating HDM-specific IL-4 or IL-13 secreting T-cells for identifying the inflammatory allergic process and its severity is the finding that these results are seen in all seasons. In fact, as we shall see below, although the number of HDM specific T-cells fluctuates with the season, results still correlate with the severity of the rhinitis.

Despite the fact that HDM allergy is a well-known per annual allergy, it was described in different studies and in different geographical regions that HDM allergen levels were influenced by seasons. In Australia, Derp 1 levels were measured in beds and peaked during late autumn with a two- to threefold higher concentration than in summer. Allergen peaks also correlated with relative humidity. Seasonal changes in allergen were not affected by the HDM avoidance intervention (41). Similar results were found in Canada (42). In the same vein,

cold winter decreased Der p1 concentration in German mattress (43). Reflecting these seasonal variations, biological parameters were also reported in the literature to fluctuate during the year. In Korea, Derf 1, a major allergen of the most frequent mite in this area, *dermatophagoides farinae*, were found increased in bedding in august and September compared with November and December, and specific IgE and IgG4 to Derf 1 showed same trends (44,45). In the Netherlands, seasonal changes were seen in serum total IgE and number of peripheral blood eosinophil corresponding to an increase in Derp 1 concentration in floor dust in autumn (46).

Our present results show that the number of circulating HDM-specific IL-4 or IL-13 secreting T-cells is increased in Autumn and early spring which are two wet seasons with high concentrations in HDM allergens as described in the literature. This suggests that an increase in HDM allergens in the environment could be the triggering factor for the increased the number of HDM-specific IL-4 or IL-13 secreting T-cells. These results are in keeping with the recent report showing a significant increase in the number of HDM-specific IL-13 and IL-4 secreting T-cells was observed 5 weeks after a bronchial provocation test to HDM (47).

In conclusion, if confirmed on a larger series of patients our data point to the potential interest of the ELISpot assay we described in the characterization of allergen-specific T cells for an improvement of diagnosis and monitoring. In addition, this tool may also benefit for a better selection of patients enrolled in desensitization studies.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the European Research Council (ERC, Hygiene N°: 250290), the Institut National de la Recherche Scientifique et Médicale and Fondation Day Solvay. The authors are indebted to M-A Selva, L.Vendrame, M. Bensaïd, M. Maschi and A. Leclercq for skillful technical assistance.

Authorship

B.M, L.C, J.J: designed the research, interpreted the data and wrote the manuscript; B.M: performed the experiments, collected and analyzed the data; J.J: coordinated the recruitment of the patients; R.G-E: contributed to the recruitment of the patients; S.C, R.C: contributed analytical tools; J-P JAIS: contributed to the statistical analysis; J-F.B: supervised the research and provided critical revision of the manuscript.

Declaration of all sources of fundings

This work was supported by grants from the European Research Council (ERC, Hygiene N°: 250290), the Institut National de la Recherche Scientifique et Médicale and Fondation Day Solvay.

Disclosure of potential conflict of interest

We disclose no conflict of interest.

REFERENCES

1. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CKW, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006;368(9537):733-743.
2. De Marco R, Cappa V, Accordini S, Rava M, Antonicelli L, Bortolami O, et al. Trends in the prevalence of asthma and allergic rhinitis in Italy between 1991 and 2010. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2012;39(4):883-892.
3. Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Grüber C, Wahn U. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet*. 2006;368(9537):763-770.
4. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol*. 2011;32(9):402-411.
5. Burks AW, Calderon MA, Casale T, Cox L, Demoly P, Jutel M, et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2013;
6. Pajno GB, Barberio G, De Luca F, Morabito L, Parmiani S. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clin. Exp. Allergy*. 2001;31(9):1392-1397.
7. Pichler CE, Helbling A, Pichler WJ. Three years of specific immunotherapy with house-dust-mite extracts in patients with rhinitis and asthma: significant improvement of allergen-specific parameters and of nonspecific bronchial hyperreactivity. *Allergy*. 2001;56(4):301-306.
8. Just J, Gouvis-Echraghi R, Rouve S, Wanin S, Moreau D, Annesi-Maesano I. Two novel, severe asthma phenotypes identified during childhood using a clustering approach. *Eur. Respir. J*. juill 2012;40(1):55-60.
9. González-Muñoz M, Villota J, Moneo I. Analysis of basophil activation by flow cytometry in pediatric house dust mite allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. juin 2008;19(4):342-347.
10. Chirumbolo S. Basophil Activation Test in Allergy: Time for an Update? *International Archives of Allergy and Immunology*. 20 janv 2012;158(2):99-114.
11. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat. Rev. Immunol*. déc 2010;10(12):838-848.

12. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology*. 3 janv 2008;8(3):183-192.
13. Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J. Immunol. Methods*. 25 mai 1988;110(1):29-36.
14. Candon S, Thervet E, Lebon P, Suberbielle C, Zuber J, Lima C, et al. Humoral and cellular immune responses after influenza vaccination in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant*. oct 2009;9(10):2346-2354.
15. Schachtner T, Müller K, Stein M, Diezemann C, Seifried A, Babel N, et al. BK virus-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated nephropathy. *Am. J. Transplant*. nov 2011;11(11):2443-2452.
16. Currier JR, Kuta EG, Turk E, Earhart LB, Loomis-Price L, Janetzki S, et al. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *Journal of Immunological Methods*. 1 févr 2002;260(1-2):157-172.
17. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. avr 2008;63 Suppl 86:8-160.
18. GINA - the Global Initiative for Asthma [Internet]. [cité 11 juill 2012]. Disponible sur: <http://www.ginasthma.org/guidelines-gina-report-global-strategy-for-asthma.html>
19. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, et al. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2004;113(1):59-65.
20. De Groot EP, Nijkamp A, Duiverman EJ, Brand PLP. Allergic rhinitis is associated with poor asthma control in children with asthma. *Thorax*. 2012;67(7):582-587.
21. Li J, Huang Y, Lin X, Zhao D, Tan G, Wu J, et al. Influence of degree of specific allergic sensitivity on severity of rhinitis and asthma in Chinese allergic patients. *Respir. Res*. 2011;12:95.
22. Pacciani V, Corrente S, Gregori S, Pierantozzi A, Silenzi R, Chianca M, et al. Correlation of Der p 2 T-cell responses with clinical characteristics of children allergic to house dust mite. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2012;109(6):442-447.
23. Moed H, Gerth van Wijk R, de Jongste JC, van der Wouden JC. Skin tests, T cell responses and self-reported symptoms in children with allergic rhinitis and asthma due to house dust mite allergy. *Clinical & Experimental Allergy*. 2009;39(2):222-227.

24. Weber-Chrysochoou C, Crisafulli D, Almqvist C, Li Q, Kemp AS, Britton WJ, et al. IL-5 T-cell responses to house dust mite are associated with the development of allergen-specific IgE responses and asthma in the first 5 years of life. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007;120(2):286-292.
25. Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T. IL-4 production by PBMCs on stimulation with mite allergen is correlated with the level of serum IgE antibody against mite in children with bronchial asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2000;105(2, Part 1):327-332.
26. Chang JH, Chan H, Quirce S, Green T, Noertjojo K, Lam S, et al. In vitro T-lymphocyte response and house dust mite-induced bronchoconstriction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996;98(5 Pt 1):922-931.
27. Van de Pol MA, Lutter R, van Ree R, van der Zee JS. Increase in allergen-specific IgE and ex vivo Th2 responses after a single bronchial challenge with house dust mite in allergic asthmatics. *Allergy.* 2012;67(1):67-73.
28. Till S, Dickason R, Huston D, Humbert M, Robinson D, Larché M, et al. IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4⁺ T cells in primary culture: relationship to expression of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997;99(4):563-569.
29. Lalvani A, Brookes R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AV, McMichael AJ. Rapid effector function in CD8⁺ memory T cells. *J. Exp. Med.* 1997;186(6):859-865.
30. Möbs C, Ipsen H, Mayer L, Slotosch C, Petersen A, Würtzen PA, et al. Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2012;130(5):1108-1116.e6.
31. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, et al. Immune Responses in Healthy and Allergic Individuals Are Characterized by a Fine Balance between Allergen-specific T Regulatory 1 and T Helper 2 Cells. *The Journal of Experimental Medicine.* 2004;199(11):1567-1575.
32. DeLong JH, Simpson KH, Wambre E, James EA, Robinson D, Kwok WW. Ara h 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;127(5):1211-1218.e3.
33. Wambre E, DeLong JH, James EA, LaFond RE, Robinson D, Kwok WW. Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4⁺ T-cell outcomes during specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012;129(2):544-551, 551.e1-7.
34. Wambre E, James EA, Kwok WW. Characterization of CD4⁺ T cell subsets in allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 2012;24(6):700-706.

35. Oseroff C, Sidney J, Vita R, Tripple V, McKinney DM, Southwood S, et al. T cell responses to known allergen proteins are differently polarized and account for a variable fraction of total response to allergen extracts. *J. Immunol.* 2012;189(4):1800-1811.
36. Parviainen S, Taivainen A, Liukko A, Nieminen A, Rytönen-Nissinen M, Kinnunen T, et al. Comparison of the allergic and nonallergic CD4⁺ T-cell responses to the major dog allergen Can f 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;126(2):406-408, 408.e1-4.
37. Aslam A, Chan H, Warrell DA, Misbah S, Ogg GS. Tracking antigen-specific T-cells during clinical tolerance induction in humans. *PLoS ONE.* 2010;5(6):e11028.
38. Van Overtvelt L, Wambre E, Maillère B, von Hofe E, Louise A, Balazuc AM, et al. Assessment of Bet v 1-specific CD4⁺ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers. *J. Immunol.* 2008;180(7):4514-4522.
39. Marcucci F, Sensi LG, Migali E, Coniglio G. Eosinophil cationic protein and specific IgE in serum and nasal mucosa of patients with grass-pollen-allergic rhinitis and asthma. *Allergy.* 2001;56(3):231-236.
40. Sensi LG, Piacentini GL, Nobile E, Ghebregzabher M, Brunori R, Zanolla L, et al. Changes in nasal specific IgE to mites after periods of allergen exposure-avoidance: a comparison with serum levels. *Clin. Exp. Allergy.* 1994;24(4):377-382.
41. Crisafulli D, Almqvist C, Marks G, Tovey E. Seasonal trends in house dust mite allergen in children's beds over a 7-year period. *Allergy.* 2007;62(12):1394-1400.
42. Chan-Yeung M, Becker A, Lam J, Dimich-Ward H, Ferguson A, Warren P, et al. House dust mite allergen levels in two cities in Canada: effects of season, humidity, city and home characteristics. *Clin. Exp. Allergy.* 1995;25(3):240-246.
43. Gehring U, Brunekreef B, Fahlbusch B, Wichmann H-E, Heinrich J. Are house dust mite allergen levels influenced by cold winter weather? *Allergy.* 2005;60(8):1079-1082.
44. Nahm DH, Park HS, Kim CW, Park JW, Hong CS. Seasonal variation of IgG subclass antibodies to house dust mite in sera from mite-sensitive asthmatic patients. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1998;80(5):411-415.
45. Nahm DH, Park HS, Kang SS, Hong CS. Seasonal variation of skin reactivity and specific IgE antibody to house dust mite. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1997;78(6):589-593.
46. Van der Heide S, De Monchy JG, De Vries K, Dubois AE, Kauffman HF. Seasonal differences in airway hyperresponsiveness in asthmatic patients: relationship with allergen exposure and sensitization to house dust mites. *Clin. Exp. Allergy.* 1997;27(6):627-633.

47. Van de Pol MA, Lutter R, van Ree R, van der Zee JS. Increase in allergen-specific IgE and ex vivo Th2 responses after a single bronchial challenge with house dust mite in allergic asthmatics. *Allergy*. 2012;67(1):67-73.

Table 1. Subjects characteristics

| group | Allergic group | Non-allergic |
|--|--------------------------------|------------------|
| Number of patients | 26 | 6 |
| Gender (male/female) | 21/5 | 4/2 |
| Age (years) [#] | 9.14 (±2.85) | 9.05 (±4.3) |
| Intermittent to mild persistent allergic rhinitis [†] | 13 (50) | 0 |
| Moderate to severe rhinitis [†] | 13 (50) | 0 |
| Controlled with low doses ICS [†] | 15 (58) | 0 |
| Uncontrolled with high doses ICS [†] | 4 (15) | 3 (50%) |
| Totale IgE (KU/L) [‡] | 294 (135.5-653.5) [*] | 191.5 (30.5-343) |
| HDM specific IgE (KU/L) [‡] | 70 (28-100) [*] | 0 |
| Derp1 specific IgE (KU/L) [‡] | 34.9 (6.7-84.7) [*] | - |
| Derp1 specific IgG4 (mgA/L) [‡] | 0.3 (0.20-0.88) ^{**} | - |

* n=25, ** n=24

Values are expressed as median[‡] (interquartile range) or mean[#] (± standard deviation) or number[†] (%)

Table 2. Associations between the severity of the rhinitis and asthma control, asthma severity, HDM sensitization, and ELISpot results.

| | OR (95%IC) | p |
|--|-----------------|-------------|
| Number of HDM-specific IL-4 secreting T cells | 1.5 (1.03-2.08) | 0.04 |
| Number of HDM-specific IL-13 secreting T cells | 1.5 (0.96-2.22) | 0.07 |
| Total IgE | 1 (0.95-1.0) | 0.1 |
| HDM specific IgE | 1 (0.86-1.27) | 0.7 |
| Specific IgE to Derp1 | 0.9 (0.74-1.12) | 0.4 |
| Asthma control | 1.1 (0.57-2.25) | 0.7 |
| Asthma severity | 1.7 (0.66-4.26) | 0.3 |

a. Univariate analysis

| | Adjusted for season | | Adjusted for gender | | Adjusted for age | | |
|--|---------------------|-----------------|---------------------|----------------|------------------|-----------------|------|
| | p | OR (95%IC) | p | OR (95%IC) | p | OR (95%IC) | p |
| Number of HDM-specific IL-4 secreting T cells | 0.04 | 2 (1.05-3.83) | 0.04 | 1.8 (1.09-2.8) | 0.02 | 1.5 (1.02-2.08) | 0.04 |
| Number of HDM-specific IL-13 secreting T cells | 0.07 | 1.7 (0.94-2.92) | 0.07 | 1.7 (1.04-2.7) | 0.03 | 1.5 (0.95-2.22) | 0.08 |

b. Multivariate analysis. Analyses were adjusted for season of blood sampling, gender or age as possible confounding factors.

Legends to figures

Figure 1

1a. Number of HDM-specific IL-13 and IL-4 secreting T-cells in allergic and non-allergic patients. Median is shown with interquartile range.

1b. Correlation diagram between the HDM-specific IL-13 and IL-4 secreting T-cells. $r = 0.88$ $p < 0.0001$

Figure 2

Representative raw data of the ELISpot in 3 different patients.

0.3×10^3 PBMC were plated in each well coated with anti-IL-4 antibody, in triplicates.

PHA was used as Positive control, RPMI as negative control and HDM extract as antigen. Each spot represents a single IL-4 secreting T-cell.

68 HDM-specific IL-4 secreting T-cells for 0.3×10^3 PBMC were detected in the patient with severe rhinitis, 31 HDM-specific IL-4 secreting T-cells for 0.3×10^3 PBMC in the patient with mild rhinitis and none by the non-allergic patient.

Figure 3

House Dust Mite-specific IL-4 (figure 3a) or IL-13 (figure 3b) secreting T-cells fluctuate with the seasons with two peaks in the fall and in early spring. Each date represents one sample from one patient.

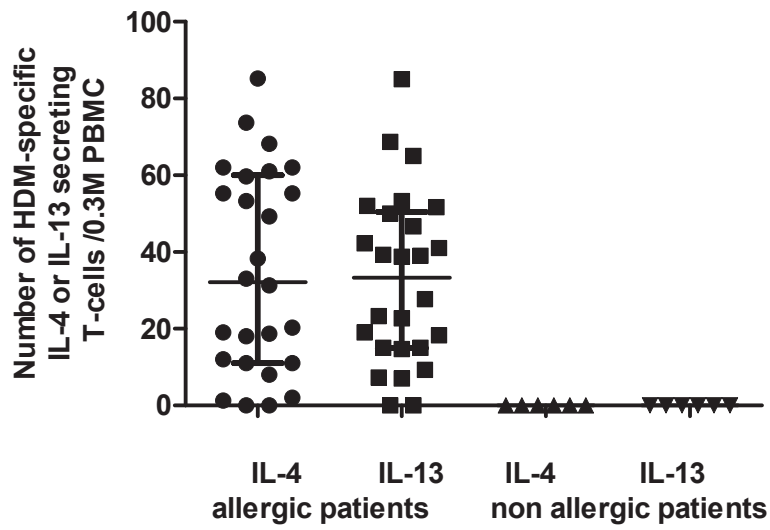


Figure 1a.

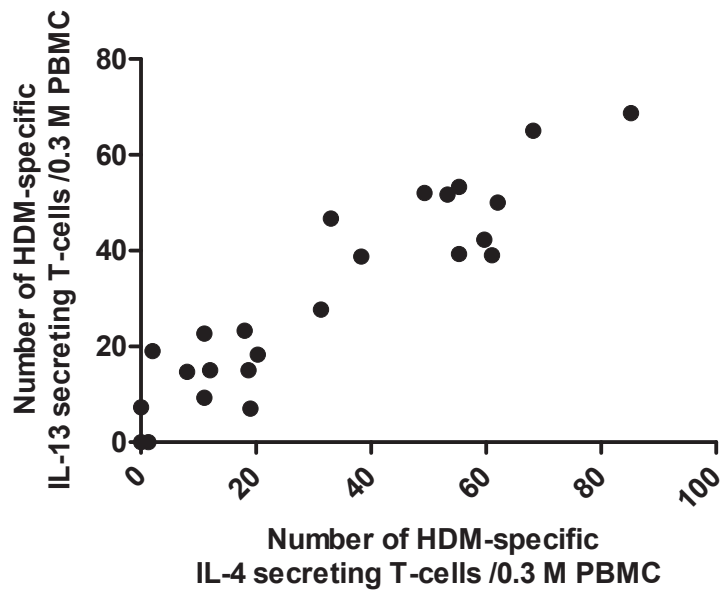


Figure 1b.

Figure 1

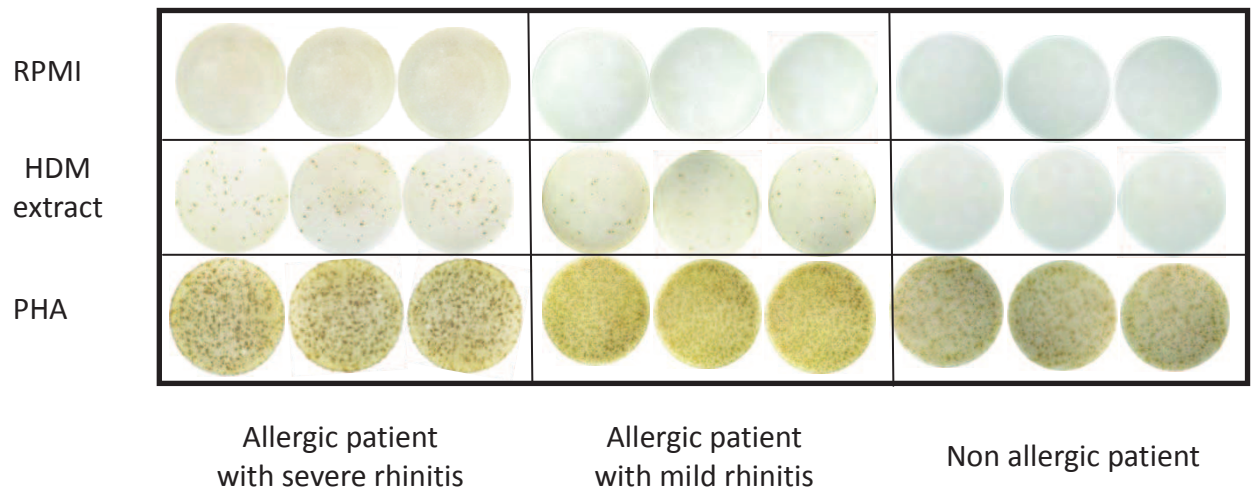


Figure 2

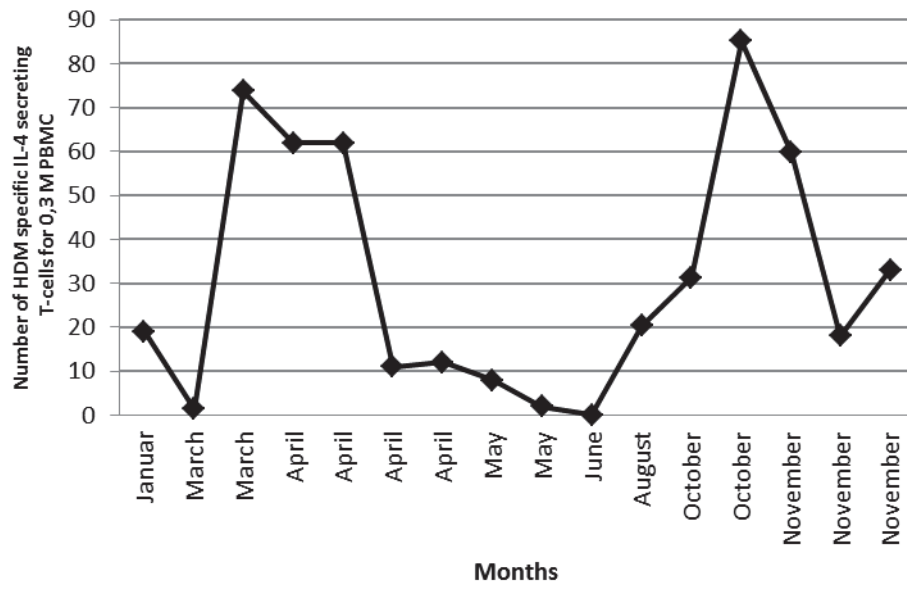


Figure 3a

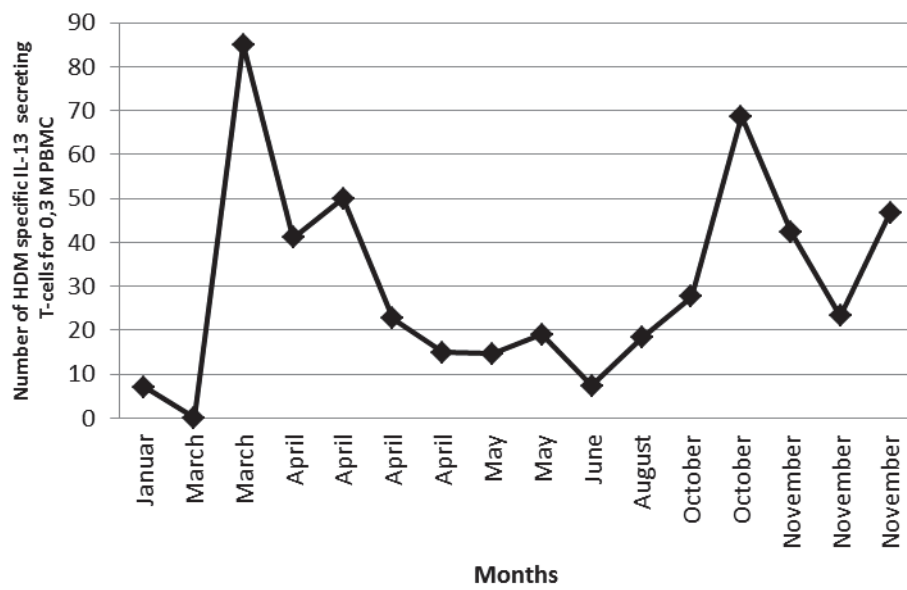


Figure 3b

Figure 3



99

RESUME

Nous avons pu montrer dans cette étude que la présence d'une réponse lymphocytaire Th2 spécifique d'antigène pouvait différencier les patients sensibilisés aux acariens des patients sains. En effet, il n'y avait aucune réponse quantifiable chez les sujets sains. En revanche, chez les enfants allergiques aux acariens, nous avons mis en évidence des cellules Th2 sécrétrices d'IL-4 et d'IL-13. La quantification de ces cellules par la méthode ELISpot a permis d'établir une corrélation entre le nombre de lymphocytes sécréteurs d'IL-4 ou d'IL-13 spécifiques d'acariens et la sévérité de la rhinite allergique. Ainsi, le nombre de cellules Th2 spécifiques des acariens dans le sang périphérique reflète étroitement la symptomatologie du patient. L'étude des lymphocytes Th2 semble donc refléter plus étroitement la physiopathologie de l'allergie que le dosage des IgE spécifiques sériques. Il a été montré, de fait, que l'étude des IgE spécifiques « in situ », c'est-à-dire au site de la réaction allergique, était mieux associée à la symptomatologie clinique que leur dosage sérique. Par ailleurs, il faut souligner que la méthode que nous avons utilisée ici est une culture cellulaire courte de 18h, ce qui permet de refléter étroitement le profil « *in vivo* » de la réponse lymphocytaire Th2 du patient contrairement aux cultures plus longues habituellement utilisées.

Nous avons également montré que le nombre de lymphocytes Th2 spécifiques d'acariens sécréteurs d'IL-4 et d'IL-13 variait au cours de l'année avec un pic au printemps et un pic à l'automne. En Europe, il a été décrit que l'exposition allergénique aux acariens était plus importante pendant ces périodes. Ce résultat reflète l'expansion des cellules Th2 mémoire en réponse à une stimulation allergénique plus importante comme il a été décrit dans les allergies saisonnières.

Au total, l'utilisation de l'ELISpot est une technique rapide et fiable permettant de diagnostiquer l'allergie aux acariens et pouvant être utilisée chez le patient polyallergique et avant de débiter une ITA.

ARTICLE 2 : Casein-specific IL-13 and IL-4 secreting T-cells: a reliable tool for diagnosis of cow's milk allergy.

(Article soumis)

B MICHAUD MD^{1,2}, J AROULANDOM MD³, N BAIZ⁴, F AMAT MD³, R GOUVIS-ECHRAGHI MD³, S CANDON MD PhD^{1,2}, R COUDERC PhD PharmaD⁵, JF BACH MD PhD^{1,2}, L CHATENOU D MD PhD^{1,2}, J JUST MD PhD^{3,4}

¹Institut national de la santé et de la recherche médicale, Unité U1013, Paris, France

²Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France.

³Allergology department, Trousseau hospital AP-HP–UPMC Paris 6, France.

⁴Epidemiology of Allergic and Respiratory diseases (EPAR) Department, UMR-S 707 INSERM, UPMC Paris 6, France.

⁵Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Trousseau hospital AP-HP, Paris, France.

Corresponding authors

Lucienne Chatenoud, MD, PhD
INSERM U1013, Hôpital Necker Enfants-malades, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris
Tel : +33 1 44 49 53 73
Fax : +33 1 43 06 23 88
E-mail: lucienne.chatenoud@inserm.fr

Jocelyne Just, MD, PhD
Hôpital Trousseau, 26 avenue du Dr Arnold Netter 75012 PARIS
Tel : + 33 1 71 73 83 02
Fax : + 33 1 44 73 66 35
E-mail : jocelyne.just@trs.aphp.fr

Declaration of all sources of funding:

This work was supported by grants from the European Research Council (ERC, *Hygiene* N°: 250290), the Institut National de la Recherche Scientifique et Médicale and Fondation Day Solvay. The laboratory is part of the RTRS (Réseau Thématique de Recherche et de Soins) « Centaure ».

Word count: 3370 words

Disclosure of potential conflict of interest

We disclose no conflict of interest.

Abstract

Background: Cow's milk allergy (CMA) is a frequent food allergy in young children. The oral food challenge is the gold standard for diagnosis and there is currently no reliable biological test.

Objective: Our aim was to evaluate the potential as a diagnosis tool of a functional assay quantitating allergen-specific Th2-cells in CMA children.

Methods: 29 children aged 2.8 to 10.5 yrs underwent a double blind placebo control food challenge (DBPCFC) to cow's milk. Blood samples were collected before performing the DBPCFC and peripheral blood mononuclear cells were cultured in an 18 hours ELISpot assay with casein, α -lactalbumin or β -lactoglobulin. The number of antigen-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells was assessed. Serum specific IgE, IgG4 and total IgE levels were measured. Receiver-operating characteristic (ROC) curves were generated.

Results: 17 (59%) children reacted to cow's milk and were considered as cow's milk allergic (CMA). The mean number of casein-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells was higher in CMA than in non-CMA children ($p=0.009$, $p=0.004$ respectively). Moreover, it was inversely correlated to the cow's milk tolerated cumulative dose ($p=0.003$, $p=0.0009$ respectively). ROC curve of combined IL-4 and IL-13 analysis was generated. AUC was 0,98 (95% CI 0.90-1.06). For a cut-off of 10 IL-4- and 12 IL-13 secreting T-cells, sensitivity and negative predictive value were 100%.

Conclusions: We propose that enumeration of casein-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells is a suitable tool to diagnose cow's milk allergy in children. If confirmed in a larger study, it could avoid performing oral food challenges.

244 words

Clinical implication

Quantifying circulating casein-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells allows the diagnosis of cow's milk allergy and avoids performing unnecessary and potentially harmful oral food challenges.

Capsule summary

The number of circulating casein-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells assessed by a functional test (the ELISpot assay) correlates with symptomatic cow's milk allergy in children and could serve as a diagnostic tool.

Key words: Th2-cell, IL-4, IL-13, cow's milk allergy, children allergy

Abbreviations

AUC: area under the curve

CMA: cow's milk allergy

ELISpot: Enzyme-Linked ImmunoSpot

GINA: Global Initiative for Asthma

HLA: human leucocyte antigen

IL- : interleukine-

IgE: immunoglobuline

NPV: negative predictive value

PHA: phytohemagglutinin

PPV: positive predictive value

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

ROC: receiver-operating characteristic

TH2 cell: type 2 helper T-cell

Se: sensitivity

Sp: Specificity

INTRODUCTION

In The United States, the prevalence of food allergy in children is 3,9% (1). It is estimated that food allergy is responsible for 125,000 annual emergency department visits, about 15,000 for food anaphylaxis, which will lead to 3,100 hospitalizations (1,2). Cow's milk allergy (CMA) is the most common food allergy in children, with rates estimated at 2% to 3% (3). Between 19% and 78% of subjects outgrow their milk allergy by 5 years of age depending on publication (4–9). Furthermore, over the past two decades, the incidence of food allergies has increased, especially in children with a delay of spontaneous regression during childhood (6,10).

Food allergy can induce from mild itching to life-threatening anaphylaxis. To date, the therapeutic management of food allergy is based on strict allergen avoidance and self-medication taught self-injectable epinephrine.

The mechanisms of development of food allergy are only partially understood. According to numerous studies, it appears that there is a defective immune tolerance to food allergens resulting in an abnormal development of Th2 cells specific for the antigen. In addition some data have shown a lack of regulation of the immune response by regulatory T cells (11–14).

There is currently no biomarker able to reliably confirm with good sensibility and sensitivity the presence or absence of CMA or to predict remission or support that tolerance was induced in an individual (15,16). Larger skin prick test weal size has been associated with persistence of CMA (4,17). Low levels of cow's milk proteins specific IgE were associated with recovery whereas levels higher than 50 kU/L were associated with the persistence of allergy (18–20). Casein specific IgE monitoring was described to have the best specificity to predict CMA (21,22). In such context, oral food challenge is still the gold standard test to assess the presence or absence of CMA according to international guidelines (3,23,24). However, this test is expensive, laborious, requiring a specialized environment and potentially associated

with a risk for anaphylaxis. Therefore, it is highly relevant to develop a biological test that may confirm or refute the diagnosis of food allergy as well as determine thresholds reactivity to the oral food challenge.

Given the importance of the role of T-cells in the pathogenesis of food allergy it seemed interesting to assess if the analysis of specific T-cell responses in cow's milk allergic children compared to non-allergic children could serve as a reliable functional biological test. To address this question, we performed a double blind placebo control food challenge (DBPCFC) in children with CMA before starting a tolerance induction protocol and monitored cow's milk proteins specific T-cell responses with the enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay.

METHODS

Study design

We performed a prospective study in children referred with cow's milk allergy to Allergology department at the Trousseau Hospital in Paris. The study protocol was approved by the Ile de France V. ethics committee. A written and standardized informed consent was obtained from all parents.

Inclusion criteria

Children with diagnosis of IgE mediated cow's milk allergy (defined as a history of reaction to the ingestion of cow's milk product and positive skin prick test (wheal \geq 3 mm in the absence of a positive reaction to the negative control) to cow's milk and specific IgE >0.35 kU/L). Children were aged more than age of natural healing, i.e. more than 3 years of age.

Double blind placebo control oral food challenge

Double blind placebo control oral food challenges were performed outside of episodes of exacerbation of acute illness. Children were admitted to the allergy clinic on 2 separate days and food challenges were performed under the supervision of an experimented allergist. A peripheral intravenous line was inserted in each patient before starting the challenge (25).

Increasing doses of cow's milk were administered 20 minutes apart. Doses were 1, 2, 5, 10, 20, 40 and 80 mL for a cumulative dose of 158 mL, corresponding to 5.7g of cow's milk proteins. The vehicle used was mashed potatoes with cow's milk or with water for placebo. Challenge was stopped in case of clinical reaction compatible with anaphylaxis. Antihistamine, methylprednisolone, bronchodilator or epinephrine was administered if necessary. Cumulative dose of cow's milk defines the reactive threshold in cow's milk

allergic (CMA) children. No clinical reaction to a cumulative dose of 158 mL of cow's milk defined non-allergic (non-CMA).

Biological markers

Measurement of Immunoglobulin E (IgE) and IgG

Serum levels of total IgE and specific IgE and IgG4 against major cow's milk allergen (casein, α -lactalbumin and β -lactoglobulin) were determined in whole blood using the immunoCAP-system (Thermo Fischer, Uppsala, Sweden).

ELISpot assay to cow's milk protein

Blood samples were collected before starting DBPC in Citrate phosphate dextrose adenine (CPDA)-pretreated blood collection tubes. They were stored at room temperature and processed within 24 hours after drawing. Mononuclear cells were isolated from blood by density gradient centrifugation using lymphocyte separation medium (EUROBIO). Ninety-six well PVDF (Millipore) plates were permeabilized for 1 minute using 35% ethanol, washed five times with PBS and coated overnight at 4° C with an anti-interleukine 13 (IL-13) antibody (U-Cytech, Utrecht, The Netherlands) following the manufacturer's instructions. Then the plates were blocked for 1 hour at 37°C with blocking solution and washed 3 times with PBS. Lymphocytes were resuspended in culture medium (RPMI 1640 from Invitrogen containing L-glutamine and supplemented with Penicillin, streptomycin and 10% fetal calf serum) and added at 0.3×10^6 per well in triplicates to coated plates together with casein (α + β + κ , 100 μ g/ml), α -lactalbumin (ALA) (50 μ g/ml), β -lactoglobulin (BLG) (50 μ g/ml), or phytohemagglutinin as positive control (PHA, 10 μ g/ml, DIFCO) or medium alone as negative control. α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and casein were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

After culture for 18 hours at 37°C, the cells were removed by extensive washing, and a secondary anti-human IL-13 or IL-4 antibody (U-Cytech) was added and incubated for 1 hour at 37°C. After extensive washing of both sides of the plate, GABA (phi-labeled anti-biotin antibodies) conjugate (U-Cytech) was added for 1-hour incubation at 37°C. After another series of washings, Activator I+II was added to visualize spots. The reaction was stopped 25 minutes later by washing with water and plates were air-dried for 1 hour before spot counting using an ELISpot reader (Autoimmun Diagnostika, Strassberg, Germany).

Two different ELISpot tests were performed to track antigen specific Th2 cells. The first one could detect antigen specific IL-4 secreting T-cells and the other one antigen specific IL-13 secreting T-cells. For the appropriate evaluation of the ELISpot assay, both positive and negative controls had to be validated. For the positive control, over 300 IL-4 or IL-13 secreting T-cells per $0.3 \cdot 10^6$ lymphocytes had to be detected in response to phytohemagglutinin. For the negative control less than 10 IL-4 or IL-13 secreting T-cells had to be detected as a non-specific response (in RPMI).

All data shown are means of triplicate wells and expressed as spot-forming cells per $0.3 \cdot 10^6$ lymphocytes.

Statistical analysis

Data are expressed as means and standard deviation (SD). Quantitative data (immunologic parameters) were compared according to two groups (positive versus negative to test results/<158 vs. >158mL of milk cumulated dose tolerated) using Mann-Whitney U tests for continuous skewed data and using Fisher's Exact tests for categorical data. To identify whether monotonic relationships exists between the immunologic parameters and the cumulated dose tolerated, Spearman rank correlation coefficients were calculated. Univariate linear model was fitted to examine the associations between the cumulated dose tolerated and

each immunologic parameter. Regression coefficients and confidence intervals provided by the regression models allowed estimating the changes in cumulated dose tolerated quantity (mL) for an increase of 1 (UNIT) in each immunologic parameter. Sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated. The cut-off levels of specific parameters were determined by analysis with the receiver-operating characteristic (ROC) curve. ROC curves were plotted and the area under the curve (AUC) was calculated to quantify the accuracy of the number of casein-specific IL-13 secreting T-cells, casein-specific IL-4 secreting T-cells as well as the ratio casein specific IgE/IgG4, each biomarkers alone or together.

Graphic display and statistical were performed using SAS statistical software version 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina). P-values < 0.05 were considered statistically significant for all analyses.

RESULTS

Subjects characteristics

Twenty nine patients were included, mean age was 5 ± 2.1 years (2.8-10.5 yrs) and 62% were boys. Mean age at diagnosis of cow's milk allergy was $4.5 (\pm 3.9)$ months. Seventeen (59%) reacted to the double blind placebo control oral food challenges and were considered as CMA children. Detailed individual patients' information regarding gender, age, age at diagnosis, oral challenge outcome (cow's milk tolerated cumulated dose, symptoms and treatment) are listed in the online repository table S1. Mean casein-specific IgE was 37.91 kU/L and 8.29 kU/L in the CMA and non-CMA children groups respectively ($p=0.006$, see table I).

Sixty-five per cent of the CMA children developed digestive symptoms, 36% cutaneous symptoms (24% localized and 12% generalized), 29% rhinoconjunctivitis and 18% bronchospasm. 88% required antihistamine, 29% corticosteroids and 18% salbutamol. None required epinephrine.

Among the 29 patients included in the protocol 24 blood samples were collected. In every patients, response to phytohemagglutinin (positive control) was over 300 antigen specific T-cells. Six patients showed a non-specific response with a number of non-specific IL-13 or IL-4 secreting T-cells over 10 and they were excluded from the analysis. Mean number of casein-specific IL-4 secreting T-cells in response to casein was $24.33 (\pm 17.86)$ in CMA children and $1.81 (\pm 3.57)$ in non-CMA children. Mean number of casein-specific IL-13 secreting T-cells was $29.75 (\pm 31.68)$ in CMA children and $2.42 (\pm 4.17)$ in non-CMA children (see figure 1). The numbers of circulating IL-4 and IL-13 secreting T-cells in response to cow's milk proteins (casein, α -lactalbumin or β -lactoglobulin) are described in table I.

Quantification of circulating CMP-specific IL-13 and IL-4 secreting T-cells in CMA and non-CMA children.

We compared the numbers of circulating cow's milk proteins specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells between non-CMA children and CMA children. The mean number of casein-specific IL-13 secreting T-cells was higher in CMA children than in non-CMA children ($p=0.004$) and the mean number of casein-specific IL-4 secreting T-cells was higher in the CMA group ($p=0.009$) (see figure 2). In the same manner, the mean ratios of serum levels of casein-specific IgE/total IgE and casein-specific IgE/IgG4 were also higher in the CMA group ($p=0.02$ and $p=0.001$ respectively) (see figure 2). In contrast, the mean numbers of α -lactalbumin-specific IL-13 or IL-4 secreting T-cells and β -lactoglobulin-specific IL-13 or IL-4 secreting T-cells were similar in the two groups.

Association between the number of CMP-specific IL-13 and IL-4 secreting T-cells and the cumulative reactive dose

The numbers of casein-specific IL-13 secreting T-cells and casein-specific IL-4 secreting T-cells were negatively correlated with the cow's milk cumulated dose tolerated ($p=0.0009$, $r=-0.22$ (and $p=0.003$, $r=-0.58$ respectively) (see figure 3). In the same way, casein specific IgE/total IgE ratios and casein specific IgE/IgG4 ratios were also negatively correlated with the cumulated cow's milk dose tolerated in dose dependent manner ($p=0.008$, $r=-0.53$ and $p=0.0004$, $r=-0.69$ respectively).

Using an univariate linear regression model we found that the higher the frequency of casein-specific IL-13 and IL-4 secreting T-cells, the lower the cumulated cow's milk dose tolerated during the food challenge ($p=0.01$ and $p<0.0001$ respectively) (see Table II).

ROC curves and ELISpot cut-points

Considering these results, quantification of the frequency of casein-specific IL-13 and IL-4 secreting T-cells appeared to be a potential candidate for the biological diagnosis of CMA. In order to identify which test would show the best specificity and the best sensitivity for the diagnosis of CMP allergy, receiver operating characteristic (ROC) curves were generated (26). Area under the curve (AUC) was 0.94 (95% CI, 0.81 – 1.00) for the frequency of casein-specific IL-13 and 0.87 (95% CI, 0.62 – 1.00) for the frequency of casein-specific IL-4 secreting T-cells (see figure 4). Combining casein-specific IL-13 and casein-specific IL-4 secreting T-cells frequencies, we found the highest AUC (0.98, 95% CI, 0.90-1.0). As shown in table III, when using a clinical decision point of 10 casein-specific IL-4 and 12 casein-specific IL-13 secreting T-cells, a specificity of 80% and a sensitivity of 100% could be achieved, with a predictive positive value of 89% and a predictive negative value approaching 100%. According to the correlation analysis (see fig 3), only one patient (whose casein-specific IgE level was as low as 0.43 KU/L) was out of the 95% prediction limits.

Furthermore, AUC was 0.81 (95% CI, 0.07-0.1) for casein specific IgE and 0.86 (95% CI, 0.63 – 1.0) for casein specific IgE/ IgG4. When using a clinical decision point of 64.5 kU/L, a specificity of 100% and a sensitivity of 27% could be achieved, with a predictive positive value of 100% but a predictive negative value of 53% (see table III).

DISCUSSION

Diagnosis of cow's milk allergy is currently based on the performance of oral challenge, the gold standard, which is laborious, requiring a specialized environment and potentially associated with a risk for anaphylaxis. With the continuous increase in incidence of food allergy, particularly in young children, the search for biological diagnostic tools has become a major need. As in respiratory allergy, a biological parameter commonly used to help in diagnosis in daily practice is the dosage of circulating allergen-specific IgE, that recently improved with the development of recombinant allergens. However, although this test, together with skin prick tests, are good markers for sensitization to allergens they do not specifically correlate with symptomatic allergy and therefore while they can help in deciding whether an oral challenge should be performed, they cannot replace it. Biological functional tests represent an interesting alternative and recently, *ex vivo* study of allergen-specific Th2 cells showed a very good correlation with clinical symptoms especially in alder pollen allergy and also in peanut allergy.

Here, we report that the *ex vivo* quantitation of circulating casein-specific Th2 cells by the ELISpot method was correlated with cow's milk tolerated cumulative dose in the provocation test and thus reliably helping to establish the diagnosis of cow's milk allergy in children.

In vitro cultures of allergen-specific Th2 cells showed long ago that Th2 cytokine production (i.e. IL-4, IL-5 or IL-13) in response to allergen was significantly higher in allergic than in non-allergic subjects (11,27,28). Recently, the development of class II tetramers was used to quantitate Th2 lymphocytes specific for some major allergens in respiratory allergy, both at the time of diagnosis and following allergen immunotherapy, and also for the diagnosis of peanut allergy (29–32). In this particular case the number of circulating CD4⁺ T-cells specific for ara h 1 (a major peanut allergen) was higher in allergic than in non-allergic subjects.

In the present work, we studied antigen-specific Th2 cells using an ELISpot method. Similarly results showed that the number of casein-specific IL-4 and IL -13 secreting T-cells was higher in cow's milk allergic (CMA) children than in non-CMA children. This test has several features that make it particularly suitable for the study of *ex vivo* cells patients. First, it is well established in the literature that culturing cells for only 18 hours in presence of the antigen allows the detection of experienced activated and memory T-cells with a high specificity. Therefore, through the detection of *in vivo* synthesized cytokines, the result of this test mirrors the *in vivo* "immune activation" status of the patient (33). Secondly, because of the high sensitivity of ELISpot, it is possible to analyze peripheral blood mononuclear cells without prior *in vitro* expansion, which is often necessary when using other methods (conventional culture or HLA class II tetramers). This was first shown in individuals recovering from a viral infection who exhibit low frequency of specific T-cells undetectable by conventional methods without a previous *in vitro* expansion in presence of the cognate antigen which, for obvious reasons, may introduce qualitative and quantitative biases (34). Third, it seems particularly suitable for biological diagnosis as the possibility to analyze responses following the use of the entire protein (casein) allows detecting the reactivity to different antigenic determinants thereby uncovering the response in a larger number of patients. Last but not least, all patients independently from their HLA haplotype can be tested. Indeed, although highly specific, a practical problem of the use of HLA class II tetramers is that it may only be applied to the patients exhibiting the HLA molecule for which the tetramer is available. Also the repertoire of the T-cells detected is by definition restricted to the peptides presented in the tetramers and importantly HLA class II tetramers, which are the ones needed to identify CD4⁺ Th2 cells are quite labor intensive to produce. In order to examine further the validity of the ELISpot assay for the diagnosis of cow's milk allergy, we confronted the data to the receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis.

The ROC curve analysis is used to evaluate the sensitivity and specificity of a diagnostic test (26). Results showed that the AUC was the highest for the diagnosis of CMA (AUC=0.96) for the analysis of both the number of IL-4 and IL-13 secreting cells. It is relevant to mention at this point that the basophil activation test has been recently proposed for the diagnosis of allergy to cow's milk. The basophil activation test to cow's milk had an area under the curve (AUC) value of 0.866 (with a positive and a negative predictive values of 81% and 96% respectively) in detecting persistent CMA patients (35). Another study described the performance of milk-specific basophil reactivity, in differentiating baked milk-tolerant from baked milk-reactive subjects (36). The ratio of milk-specific basophil reactivity to non-specific (anti-IgE) basophil activation was higher in those reacting to all forms of baked milk whereas it was lower in subjects who tolerated heated milk. Milk-specific basophil reactivity had an AUC of 0.69. Comparing as a whole these data to our present results, the ELISpot assay appears to be more suitable for CMA diagnosis even though side by side comparison of the two assays should be carried out to draw definitive conclusion.

With the ELISpot assay, we described for the first time a relationship between the number of casein-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells and the cow's milk cumulated dose tolerated in the oral challenge. In other words, the higher the number of casein-specific Th2 cells, the lower the cumulated dose of cow's milk tolerated. Moreover, as previously discussed, the ROC curve showed that the test was very reliable for the diagnosis of CMA, a finding in complete contrast to what first described for the determination of specific IgE. Thus, the detection of circulating allergen-specific T-cells appears to closely mirror the pathophysiology of symptomatic food allergy and in a much better way than the detection of antigen specific IgE. Different hypothesis may be proposed to explain this. First, the level of specific IgE *in situ* is better correlated with allergic symptoms than circulating specific IgE levels, a well demonstrated fact in allergic rhinitis. In fact, in a series of patients presenting

grass pollen allergy, specific IgE in the nasal mucosa showed a better correlation with allergen exposure than serum evaluations (37). Similarly, in house dust mite allergic children presenting rhinitis and asthma, specific IgE in the nasal mucosa increased significantly during allergen exposure while serum house dust mite specific IgE did not (38). Secondly, the data emphasizes the relevance of directly detecting antigen-specific Th2 cells which key role in the development of allergic symptoms was recently highlighted by the immunological monitoring of patients desensitized to birch (39). In this study, the authors described a significant reduction in circulating Bet v 1 -specific Th2 cells (a major allergen from birch), detected by ELISpot, in patients successfully desensitized. Similarly, with the use of type II tetramers a significant decrease of Aln 1 g -specific Th2 cells after effective desensitization to alder pollen compared to non-desensitized patients was reported (31). Here again, it is interesting to highlight that, during specific immunotherapy, the decrease in allergen specific IgE is delayed and does not correlate with clinical symptoms, probably due to the persistence of long lived plasma cells.

Our final goal of applying this test is to assess with as much certainty as possible that a child is not allergic to cow's milk and thus reduce the risk of allergic reaction during oral challenge. Therefore, the threshold values for each of the two associated tests that have the highest negative predictive value were determined. It appeared that the combination of the values of 10 casein-specific IL- 4 and 12 casein-specific IL-13 secreting T-cells provides a negative predictive value approaching 100%. With this same threshold a positive predictive value of 89 % of cases was obtained. Thus, when the result is below this threshold, the diagnosis of CMA is very unlikely whereas when it is above this threshold, it seems more reasonable to delay the oral challenge or perform it with all the needed precautions. If confirmed on a larger series of patients, the ELISpot assay we described to characterize casein-specific T-cells could

represent a significant help to diagnose CMA, to avoid dangerous or useless oral challenge and to monitor patients under oral immunotherapy.

While awaiting this formal confirmation, the casein-specific ELISpot may still be very useful to better guide the clinician's attitude towards the oral challenge, namely to distinguish between patients with a low or high risk to develop serious reactions. As a whole, the present data point to the *ex vivo* study of allergen-specific Th2 cells as a reliable tool to diagnose symptomatic food allergy.

REFERENCES

1. Branum AM, Lukacs SL. Food Allergy Among Children in the United States. *Pediatrics*. déc 2009;124(6):1549-1555.
2. Kuehn BM. Food allergies becoming more common. *JAMA J Am Med Assoc*. 26 nov 2008;300(20):2358.
3. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol*. déc 2010;126(6 Suppl):S1-58.
4. Elizur A, Rajuan N, Goldberg MR, Leshno M, Cohen A, Katz Y. Natural course and risk factors for persistence of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Pediatr*. sept 2012;161(3):482-487.e1.
5. Ahrens B, Lopes de Oliveira LC, Grabenhenrich L, Schulz G, Niggemann B, Wahn U, et al. Individual cow's milk allergens as prognostic markers for tolerance development? *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. nov 2012;42(11):1630-1637.
6. Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. nov 2007;120(5):1172-1177.
7. Vanto T, Helppilä S, Juntunen-Backman K, Kalimo K, Klemola T, Korpela R, et al. Prediction of the development of tolerance to milk in children with cow's milk hypersensitivity. *J Pediatr*. févr 2004;144(2):218-222.
8. Bishop JM, Hill DJ, Hosking CS. Natural history of cow milk allergy: clinical outcome. *J Pediatr*. juin 1990;116(6):862-867.
9. Wood RA, Sicherer SH, Vickery BP, Jones SM, Liu AH, Fleischer DM, et al. The natural history of milk allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol*. mars 2013;131(3):805-812.
10. Cantani A, Micera M. Natural history of cow's milk allergy. An eight-year follow-up study in 115 atopic children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. août 2004;8(4):153-164.
11. Beyer K, Castro R, Birnbaum A, Benkov K, Pittman N, Sampson HA. Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *J Allergy Clin Immunol*. avr 2002;109(4):707-713.
12. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med*. 21 juin 2004;199(12):1679-1688.

13. Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. Adaptive Foxp3⁺ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity*. 18 juill 2008;29(1):114-126.
14. Shreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol*. janv 2009;123(1):43-52.e7.
15. Järvinen KM, Celestin J. What's on the menu for prediction of natural history of cow's milk allergy beyond casein cocktails and epitope soup? *Clin Exp Allergy*. 2012;42(11):1549-51.
16. Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, Spitzauer S, Valenta R. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods San Diego Calif*. 15 août 2013;
17. Fiocchi A, Terracciano L, Bouygue GR, Veglia F, Sarratud T, Martelli A, et al. Incremental prognostic factors associated with cow's milk allergy outcomes in infant and child referrals: the Milan Cow's Milk Allergy Cohort study. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. août 2008;101(2):166-173.
18. Ahrens B, Lopes de Oliveira LC, Grabenhenrich L, Schulz G, Niggemann B, Wahn U, et al. Individual cow's milk allergens as prognostic markers for tolerance development? *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. nov 2012;42(11):1630-1637.
19. James JM, Sampson HA. Immunologic changes associated with the development of tolerance in children with cow milk allergy. *J Pediatr*. sept 1992;121(3):371-377.
20. Sicherer SH, Sampson HA. Cow's milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. avr 1999;29(4):507-512.
21. Ito K, Futamura M, Movérare R, Tanaka A, Kawabe T, Sakamoto T, et al. The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children. *Clin Mol Allergy CMA*. 2012;10(1):1.
22. Shek LPC, Bardina L, Castro R, Sampson HA, Beyer K. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy*. juill 2005;60(7):912-919.
23. Eigenmann PA. Are specific immunoglobulin E titres reliable for prediction of food allergy? *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. mars 2005;35(3):247-249.
24. Celik-Bilgili S, Mehl A, Verstege A, Staden U, Nocon M, Beyer K, et al. The predictive value of specific immunoglobulin E levels in serum for the outcome of oral food challenges. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. mars 2005;35(3):268-273.

25. Nowak-Węgrzyn A, Assa'ad AH, Bahna SL, Bock SA, Sicherer SH, Teuber SS. Work Group report: Oral food challenge testing. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2009;123(6):S365-S383.
26. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem.* avr 1993;39(4):561-577.
27. Tsuge I, Kondo Y, Tokuda R, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, et al. Allergen-specific helper T cell response in patients with cow's milk allergy: Simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution assay. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* déc 2006;36(12):1538-1545.
28. Tiemessen MM, Van Ieperen-Van Dijk AG, Bruijnzeel-Koomen CA f m, Garssen J, Knol EF, Van Hoffen E. Cow's milk-specific T-cell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy: key role for IL-10. *J Allergy Clin Immunol.* mai 2004;113(5):932-939.
29. DeLong JH, Simpson KH, Wambre E, James EA, Robinson D, Kwok WW. Ara h 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* mai 2011;127(5):1211-1218.e3.
30. Van Overtvelt L, Wambre E, Maillère B, von Hofe E, Louise A, Balazuc AM, et al. Assessment of Bet v 1-specific CD4+ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 avr 2008;180(7):4514-4522.
31. Wambre E, DeLong JH, James EA, LaFond RE, Robinson D, Kwok WW. Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4+ T-cell outcomes during specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2012;129(2):544-551, 551.e1-7.
32. Wambre E, James EA, Kwok WW. Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. *Curr Opin Immunol.* déc 2012;24(6):700-706.
33. Cox JH, Ferrari G, Janetzki S. Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay. *Methods San Diego Calif.* avr 2006;38(4):274-282.
34. Lalvani A, Brookes R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AV, McMichael AJ. Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med.* 15 sept 1997;186(6):859-865.
35. Rubio A, Vivinus-Nébot M, Bourrier T, Saggio B, Albertini M, Bernard A. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy.* janv 2011;66(1):92-100.

36. Ford LS, Bloom KA, Nowak-Węgrzyn AH, Shreffler WG, Masilamani M, Sampson HA. Basophil reactivity, wheal size, and immunoglobulin levels distinguish degrees of cow's milk tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2013;131(1):180-186.e1-3.
37. Marcucci F, Sensi LG, Migali E, Coniglio G. Eosinophil cationic protein and specific IgE in serum and nasal mucosa of patients with grass-pollen-allergic rhinitis and asthma. *Allergy.* mars 2001;56(3):231-236.
38. Sensi LG, Piacentini GL, Nobile E, Ghebregzabher M, Brunori R, Zanolla L, et al. Changes in nasal specific IgE to mites after periods of allergen exposure-avoidance: a comparison with serum levels. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* avr 1994;24(4):377-382.
39. Möbs C, Slotosch C, Löffler H, Jakob T, Hertl M, Pfützner W. Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 févr 2010;184(4):2194-2203.

Table I: Patients characteristics.

| | CMA | | | Non-CMA | | | p-value (χ^2) | Entire population | | |
|---------------------------|----------|------------------|-----------|---------|------------------|------------|-------------------------|-------------------|-----------------|----------|
| | n | Mean (SD) | IQR | n | Mean (SD) | IQR | | n | Mean (SD) | IQR |
| Age (years) | 17 | 5,3 (2,3) | 3,7 | 12 | 4,4 (1,8) | 2,9 | 0.22 | 29 | 5.08 | 3.5 2 |
| male/female | 11/ 6 | | | 7/ 5 | | | 0.95 | 18/11 | | |
| Age at diagnosis (months) | 17 | 3,8 (3,2) | 4 | 12 | 5,6 (4,6) | 4,8 | 0.98 | 29 | 4.55 (3.88) | 5 |
| Casein sIgE | 12 | 37.9 (75.1) | 37 | 15 | 8.29 (18.9) | 0.38 | 0.006 | 27 | 24.7 (58.4) | 11. 3 |
| Casein sIgE/ IgE | 13 | 0.09 (0.12) | 0.11 | 11 | 0.004 (0.005) | 0.01 | 0.02 | 24 | 0.05 (0.1) | 0.0 6 |
| ALA sIgE/ IgE | 13 | 0.04 (0.04) | 0.04 | 11 | 0.007 (0.01) | 0.006 | 0.008 | 24 | 0.02 (0.04) | 0.0 4 |
| BLG sIgE/ IgE | 13 | 0.02 (0.03) | 0.03 | 11 | 0.01 (0.03) | 0.002 | 0.06 | 24 | 0.02 (0.03) | 0.0 2 |
| Casein sIgE/sIgG4 | 12 | 0.12 (0.36) | 0.04 | 10 | 0.003 (0.004) | 0.003 | 0.001 | 22 | 0.07 (0.3) | 0.0 1 |
| ALA sIgE/sIgG4 | 11 | 0.13 (0.33) | 0.04 | 8 | 0.003 (0.006) | 0.001 4 | 0.001 | 19 | 0.08 (0.3) | 0.0 4 |
| BLG sIgE/sIgG4 | 9 | 0.015 (0.018) | 0.01 | 10 | 0.006 (0.01) | 0.007 | 0.05 | 19 | 0.01 (0.02) | 0.0 1 |
| Casein IL-4 T-cells | 6 | 24.33 (17.86) | 21 | 8 | 1.81 (3.57) | 2.5 | 0.009 | 14 | 11.46(16.2) | 21 |
| ALA IL-4 T-cells | 6 | 2.58 (3.07) | 6 | 8 | 1.88 (4.91) | 0.5 | 0.37 | 14 | 2.18 (4.1) | 3 |
| BLG IL-4 T-cells | 6 | 3.08 (4.78) | 9 | 8 | 0.88 (2.48) | 0 | 0.28 | 14 | 1.8 (3.7) | 0 |
| Casein IL-13 T-cells | 12 | 25.46 (31.68) | 29.7 5 | 9 | 2.42 (4.17) | 4.8 | 0.004 | 21 | 15.6 (26.4) | 18 |
| ALA IL-13 T-cells | 9 | 17.56 (28.05) | 8 | 8 | 8.85 (11.52) | 16 | 0.28 | 17 | 13.5 (21.7) | 15. 5 |
| BLG IL-13 T-cells | 9 | 15.5 (20.43) | 8 | 8 | 3.91 (5.04) | 5.5 | 0.08 | 17 | 10.05 (16.0) | 10. 5 |

SD : standard deviation ; IQR : interquartile range ; p value for Mann-Whitney U tests (continuous variables) and for Fisher's Exact tests (categorical data). Bold face values indicate statistical significance. s, specific. Casein/ALA/BLG IL-4 T-cells: number of casein/ALA/BLG specific IL-4 secreting T-cells for 300 000 lymphocytes. Casein/ALA/BLG IL-13 T-cells: number of casein/ALA/BLG specific IL-13 secreting T-cells for 300 000 lymphocytes. IgE: total immunoglobulin E (kU/L). sIgE : specific immunoglobulin E (kU/L). sIgG4: specific immunoglobulin G4 (mga/L)

Table II: Association between CMP cumulated dose tolerated and different biological parameters.

| | β | 95% confidence limits | p-value* |
|-----------------------------|-----------------|-------------------------|-------------------|
| Casein sIgE | -0.39 | -0.85-0.07 | 0.1 |
| Casein sIgE /IgE | -406.2 | -654- -158.5 | p=0.001 |
| ALA sIgE /IgE | -1045.42 | -1684.55- -406.3 | p=0.001 |
| BLG sIgE /IgE | -562.07 | -1451.15 ; 327.01 | 0.22 |
| Casein sIgE/IgG4 | -62.7 | -173.9-48.55 | p=0.3 |
| ALA sIgE/IgG4 | -71.9 | -196,2-52.5 | p=0.3 |
| BLG sIgE/IgG4 | -1771.36 | (-3793.44-250.7) | p=0.09 |
| Casein IL-4 T-cells | -3.44 | (-4.96- -1.92) | p<0.001 |
| ALA IL-4 T-cells | -1.5 | (-10.82- -7.8) | p=0.8 |
| BLG IL-4 T-cells | -7.7 | (-17.3- 2.00) | p=0.12 |
| Casein IL-13 T-cells | -1.4 | (-2.36- -0.34) | p=0.009 |
| ALA IL-13 T-cells | -0.74 | (-2.24 ; 0.77) | 0.34 |
| BLG IL-13 T-cells | -1.79 | (-3.71 ; 0.14) | 0.07 |

Regression coefficients and confidence intervals provided by the univariate linear regression models allowed estimating the changes in cumulated dose tolerated quantity (mL) for an increase of 1 (UNIT) in each immunologic parameter. Boldface values indicate statistical significance.

Casein/ALA/BLG IL-4 T-cells: number of casein/ALA/BLG specific IL-4 secreting T-cells for 300 000 lymphocytes. Casein/ALA/BLG IL-13 T-cells: number of casein/ALA/BLG specific IL-13 secreting T-cells for 300 000 lymphocytes. IgE: total immunoglobulin E (kU/L), sIgE : specific immunoglobulin E (kU/L), sIgG4: specific immunoglobulin G4 (mga/L)

Table III

Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values for different cut-points

| Positivity Cut-off | Se (%) | Spe (%) | PPV (%) | NPV (%) |
|--|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Casein IL-13 T-cells = 5 | 89 | 75 | 73 | 90 |
| Casein IL-13 T-cells=12 | 10 | 58 | 64 | 100 |
| Casein IL-4 T-cells = 10 | 100 | 83 | 89 | 100 |
| Casein IL-4 T-cells =10 + Casein IL-13 T-cells=12 | 100 | 80 | 89 | 100 |
| Casein sIgE=50.5 | 27 | 92 | 80 | 50 |
| Casein sIgE=64.5 | 27 | 100 | 100 | 53 |
| Casein sIgE/IgG4=0.0015 | 60 | 1 | 1 | 75 |
| Casein sIgE/IgG4=0.0032 | 80 | 92 | 89 | 85 |
| Casein sIgE/IgG4=0.0011 | 1 | 67 | 71 | 100 |

Casein IL-4 T-cells: number of casein specific IL-4 secreting T-cells for 300 000 lymphocytes

Casein IL-13 T-cells: number of casein specific IL-13 secreting T-cells for 300 000 lymphocytes

Se: sensitivity, Spe : specificity, PPV: predictive positive value, NPV: negative predictive value

Figure legends

Figure 1

Representative raw data of the ELISpot in 2 different patients.

0.3×10^3 PBMC were plated in each well coated with anti-IL-13 antibody, in triplicates.

PHA was used as Positive control, RPMI as negative control and casein as antigen.

Each spot represents a single IL-13 secreting T-cell.

33 casein-specific IL-13 secreting T-cells for 0.3×10^3 PBMC were detected in the CMA-patient and none in the non-CMA patient.

Figure 2

Comparison of biological test outcomes between CMA and non-CMA patients. A. Casein specific IgE/ total IgE ratio. B. Casein specific IgE/IgG4 ratio. C. Number of IL-13 secreting T-cells. D. Number of IL-4 secreting T-cells.*p-value for Mann-Whitney U tests.

Figure 3

Correlation diagram between the cumulative dose tolerated and ELISpot test results. A. Number of IL-13 secreting T-cells. B. Number of IL-4 secreting T-cells.*p-value for Spearman rank correlation.

Figure 4

Receiver operating characteristic (ROC) curves showing performance of 3 tests in predicting clinical reactivity to milk. A. Casein-specific IL-13 secreting T-cells (AUC= 0.94; 95% CI, 0.81 – 1.00), casein-specific IL-4 secreting T-cells (AUC = 0.87; 95% CI,

0.62 – 1.00) and casein specific IgE/IgG4 (AUC =0.86; 95% CI, 0.63 – 1.00). B. Casein-specific IL-13 secreting T-cells and casein-specific IL-4 secreting T-cells combined (AUC=0.98; 0.90-1.06).

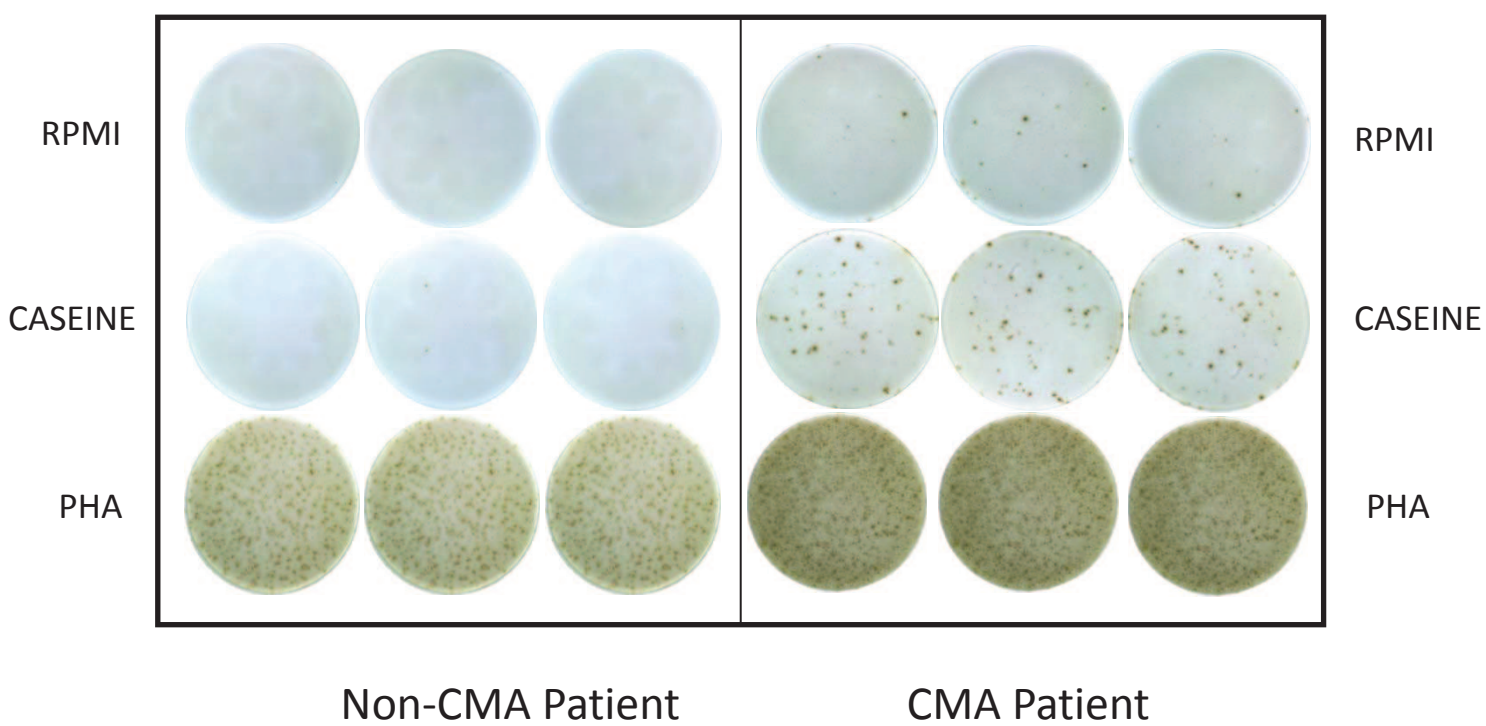


Figure 1

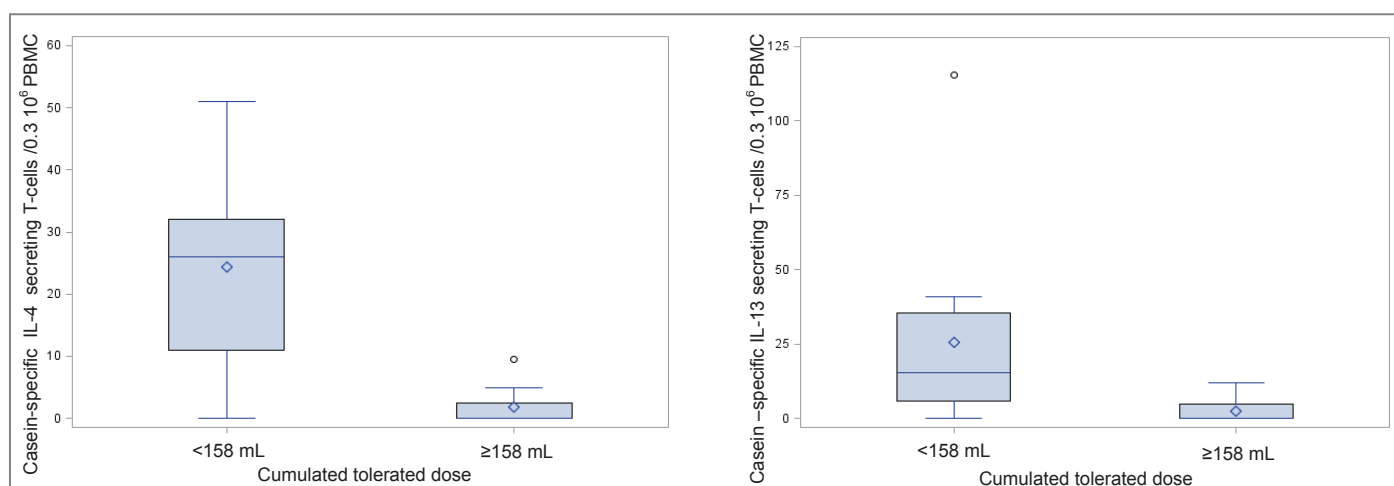
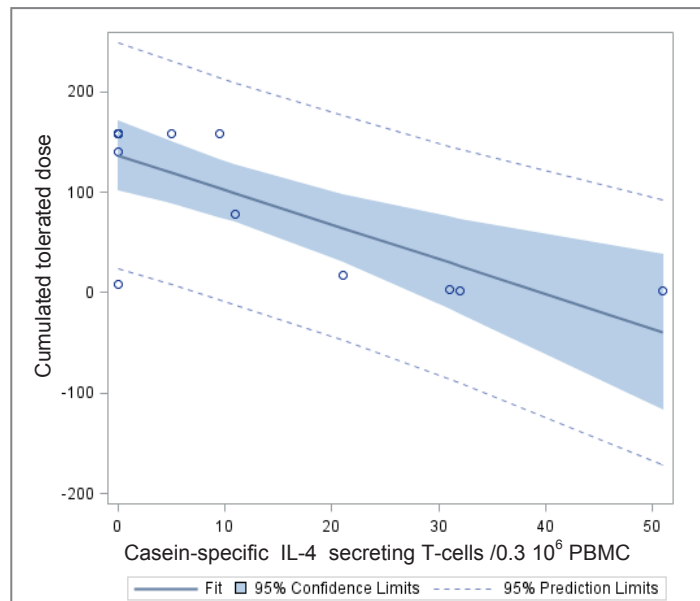


Figure 2



*p-value for Spearman rank correlation

Figure 3

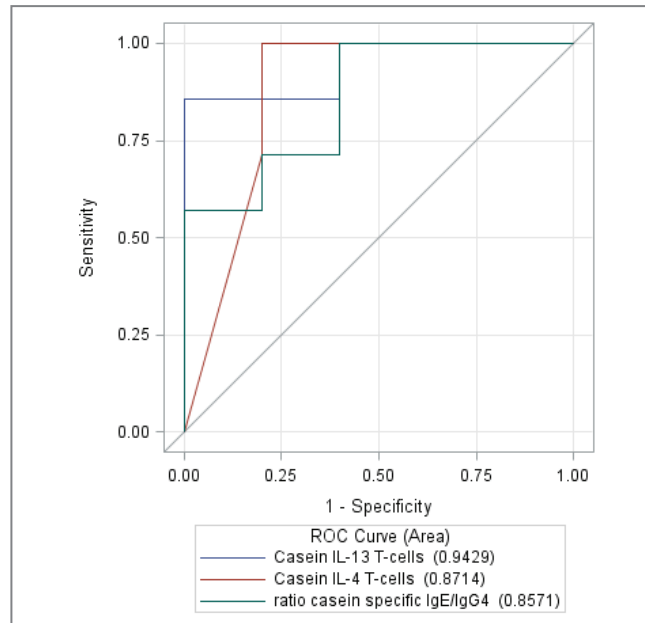


Figure 4a

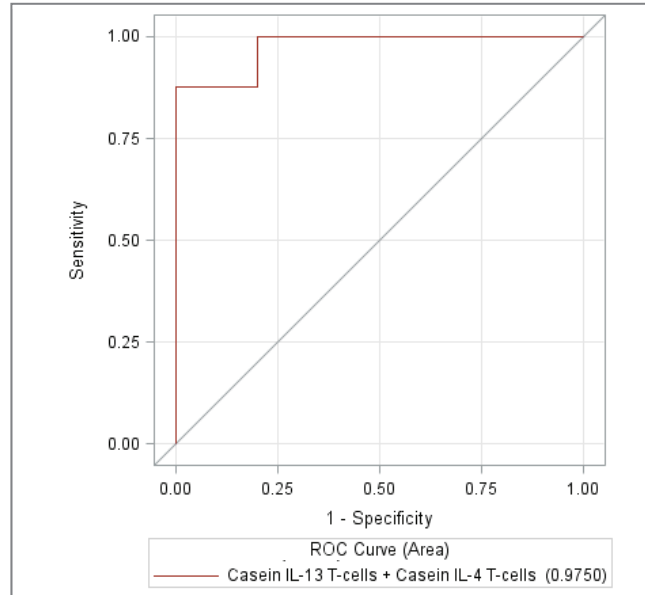


Figure 4b

| Patient | Gender | Age (years) | Age of diagnosis (months) | Oral challenge outcome | | |
|---------|--------|-------------|---------------------------|--|---|--------------------------------------|
| | | | | Cow's milk cumulated tolerated dose (mL) | Symptoms | Treatment |
| 1 | Boy | 6.5 | 8 | 3.87 | Pharyngeal itching | Anti H1 |
| 2 | Boy | 2.8 | 5 | 18.87 | Abdominal pain, conjunctivitis | Anti H1 |
| 3 | Boy | 8.2 | 5 | 158 | None | |
| 4 | Boy | 5.5 | 2 | 17 | Abdominal pain, rhinitis, conjunctivitis | Anti H1, corticosteroids |
| 5 | Boy | 2.9 | 1 | 158 | None | |
| 6 | Girl | 10.5 | 6 | 78 | Abdominal pain, vomiting | Anti H1, corticosteroids |
| 7 | Girl | 5.9 | 4 | 158 | None | |
| 8 | Boy | 7.9 | 8 | 1.87 | Facial urticaria, asthma | Anti H1, corticosteroids, salbutamol |
| 9 | Boy | 5.9 | 7 | 158 | None | |
| 10 | Girl | 4.6 | 4 | 18.87 | Cough, pharyngeal itching, rhinitis, conjunctivitis | Anti H1 |
| 11 | Girl | 7.9 | 1 | 78 | Vomiting | Anti H1 |
| 12 | Boy | 8.2 | 3 | 0.87 | Abdominal pain, facial urticaria, asthma | Anti H1, corticosteroids, salbutamol |
| 13 | Girl | 3.4 | 1 | 78 | Abdominal pain, facial urticaria | Spontaneous resolution |
| 14 | Boy | 3 | 1 | 158 | None | |
| 15 | Boy | 3.1 | 1 | 18 | Facial urticaria | Anti H1 |
| 16 | Girl | 4 | 2 | 8 | Abdominal pain, pharyngeal itching | Anti H1 |
| 17 | Boy | 3.4 | 8 | 158 | None | |
| 18 | Boy | 2.7 | 4 | 158 | None | |
| 19 | Girl | 6.6 | 3 | 158 | None | |
| 20 | Boy | 4.6 | 2 | 8 | Abdominal pain, vomiting | Anti H1 |
| 21 | Girl | 4.2 | 12 | 158 | None | |
| 22 | Girl | 3.4 | 5 | 158 | None | |
| 23 | Boy | 3 | 1 | 158 | None | |
| 24 | Girl | 4.2 | 1 | 3 | Pharyngeal itching, rhinitis, asthma, vomiting | Anti H1, corticosteroids, salbutamol |
| 25 | Boy | 4.5 | 4 | 1.87 | Rhinitis, conjunctivitis, urticaria | Anti H1 |
| 26 | Boy | 7.1 | 5 | 18 | Abdominal pain, pharyngeal itching | Anti H1 |
| 27 | Boy | 3 | 12 | 0.87 | Diarrhea | Spontaneous resolution |
| 28 | Boy | 3 | 0 | 18.87 | Urticaria | Anti H1 |
| 29 | Girl | 4 | 16 | 158 | None | |

S1. Detailed individual patients' information regarding gender, age, age at diagnosis, oral challenge outcome (cow's milk tolerated cumulated dose, symptoms and treatment).

RESUME

Nous avons montré que le nombre de cellules circulantes spécifiques de la caséine et sécrétrices d'IL-4 et d'IL-13 était significativement plus élevé chez les enfants allergiques au lait de vache que chez les enfants non allergiques. Par ailleurs, il était corrélé à la dose de lait réactogène lors du TPO. La réalisation d'une courbe ROC a permis de montrer qu'en associant la quantification des lymphocytes sécréteurs d'IL-4 et d'IL-13, on obtenait une AUC de 0.98 (95% CI 0.90-1.06). En utilisant des valeurs limites de 10 et 12 pour le nombre de cellules sécrétrices d'IL-4 et d'IL-13 respectivement, on obtient une sensibilité et une valeur prédictive négative approchant 100% pour la prédiction de l'allergie au lait de vache par cette méthode. Ce résultat est plus pertinent que le dosage des IgE spécifiques de la caséine (AUC=0.86) ou le rapport IgE/IgG4 spécifiques de la caséine (AUC=0.86). La quantification des lymphocytes Th2 circulants spécifiques de la caséine reflète donc plus étroitement la physiopathologie de l'allergie au lait que le dosage des IgE ou IgG sériques. L'utilisation de tétramères de classe II a permis de quantifier les cellules Th2 spécifiques d'Ara h 1. Chez les sujets allergiques à l'arachide, le nombre de cellules Th2 spécifiques d'Ara h 1 était plus élevé que chez les sujets tolérants. Ces résultats confirment tout comme nos données que la numération des cellules spécifiques d'allergène dans le sang périphérique est un bon marqueur de l'allergie alimentaire. L'intérêt de l'ELISpot que nous décrivons est qu'il s'agit d'une culture courte, de 18 heures, pouvant fournir des résultats dans les 24 heures. Il permet en outre une exploration à la fois semi-quantitative et qualitative de la réponse Th2 spécifique d'allergène. Par rapport à ce genre de test, la génération de tétramères de classe II est laborieuse, seuls les patients présentant la molécule HLA correspondante peuvent être explorés et enfin seule la réponse à certains peptides allergéniques est analysée.

ARTICLE 3 : Etude comparative de l'immunothérapie sous-cutanée et sublinguale chez l'enfant asthmatique allergique aux acariens: effet thérapeutique et mécanismes immunologiques

Comparing subcutaneous and sublingual immunotherapy in mite allergic asthmatic children: therapeutic efficacy and immunological mechanisms.

(Article en cours de préparation)

B MICHAUD MD^{1,2}, R GOUVIS-ECHRAGHI MD³, S CANDON MD PhD^{1,2}, R COUDERC PhD PharmaD⁴, JF BACH MD PhD^{1,2}, L CHATENOU D MD PhD^{1,2}, J JUST MD PhD³,

¹ Institut national de la santé et de la recherche médicale, Unité 1013, PARIS, France

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France

³ Groupe hospitalier Trousseau-la Roche Guyon, Université Pierre et Marie Curie, Centre de l'Asthme et des Allergies, Paris, France

⁴ Groupe hospitalier Trousseau-la Roche Guyon, Université Pierre et Marie Curie, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Paris, France

INTRODUCTION

L'incidence de l'allergie ne cesse d'augmenter dans les pays industrialisés et notamment chez l'enfant. L'allergie aux acariens est l'allergie per-annuelle la plus fréquente en Europe, à l'origine de symptômes variant de la rhino-conjonctivite allergique à l'asthme sévère. L'unique traitement curatif est l'immunothérapie spécifique d'allergène (ITA). Elle permet une amélioration de la symptomatologie clinique et évite l'apparition d'une polysensibilisation. Initialement administrée par voie sous-cutanée, elle est actuellement de plus en plus utilisée par voie sub-linguale. Les mécanismes immunologiques ont été abordés dans de nombreuses études mais sont encore mal connus, probablement du fait de leur multiplicité en fonction des allergènes, des voies d'administrations et de la diversité des populations étudiées.

Il a clairement été montré que le statut allergique d'un individu dépend d'un équilibre subtil entre les cellules T $CD4^+$ spécifiques d'antigène polarisées Th2 et celles polarisées Th1. Au cours de la désensibilisation, il semblerait que cet équilibre s'inverse sans qu'il soit clairement établi que les cellules Th1 spécifiques d'antigène augmentent ou que les cellules Th2 diminuent, les résultats à ce sujet étant divergents. Par ailleurs, Il a été démontré que l'ITA induit l'émergence de cellules T $CD4^+$ suppressives spécifiques d'allergène(s) et fortement productrices d'IL-10, dites Tr1. Une induction de cellules T régulatrices Foxp3⁺ a également été décrite. Jusqu'à ce jour, il n'existe pas d'examen biologique permettant de suivre et d'affirmer l'effet de l'ITA. Dans ce travail, nous avons étudié la réponse lymphocytaire T dans 2 groupes d'enfants asthmatiques avant et après 1 an de désensibilisation aux acariens, l'un par voie sous-cutanée et l'autre par voie sub-linguale.

PATIENTS AND METHODS

Patients population

The patients we analyzed were part of the 2 years (2011-2012) Trousseau Asthma Program at the Hospital Trousseau in Paris.

Inclusion criteria were: 1) age higher than 5 years, 2) diagnosis of active asthma (defined as a history of recurrent wheeze or more than 3 episodes of reversible bronchial obstruction documented within the previous 6 months), 3) absence of other chronic obstructive pulmonary diseases (congenital or acquired), 4) *Allergic rhinitis*, assessed using the questionnaire from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)⁸ and rhinitis severity was determined according to the World Health Organization (WHO) ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) Guidelines, based on the impact of rhinitis upon patient quality of life (252) 5) presence of allergic sensitization to HDM [defined as positive skin prick test (wheal ≥ 3 mm compared to negative control) and specific IgE ≥ 0.35 kU/L against *Dermatophagoides pteronyssinus* in absence of sensitization to perennial allergens (mould, cockroach, cat and dog) and of clinical symptoms of seasonal allergy (birch and grass pollen), 5) the achievement of clinical examination outside of episodes of exacerbation or acute respiratory illness before initiation of specific immunotherapy 6) and finally having no previous specific immunotherapy.

Asthma was defined as intermittent, mild persistent, moderate persistent, or severe persistent according to the Global Initiative for Asthma (GINA) 2005 (253). All enrolled children were treated with fixed dose of inhaled corticosteroids (ICS) for at least 6 months and were compliant with their prescribed treatment. High doses of ICS were defined as 500 μg or more of fluticasone (or its equivalent) per day. The control of asthma was assessed according to GINA 2009 and to Asthma Control Test (ACT) (254). The outcome of treatment was ranked

as: controlled with or without high-dose ICS, or uncontrolled (including partially controlled) with or without high-dose of ICS.

27 patients (mean age 10 years, 5.6-15.3) were included. 10 had severe persistent asthma, 12 moderate persistent asthma and 5 mild persistent asthma. 21 were controlled with low doses of ICS and 6 with high doses of ICS. 11 had intermittent to mild persistent rhinitis and 16 had moderate to severe persistent rhinitis.

The study protocol was approved by the île de France 2 ethics committee and all parents and children over 11years gave written informed consent.

Allergen immunotherapy

15 patients underwent sub-lingual AIT (SLIT) and 12 sub-cutaneous AIT (SCIT).

The standardized extract used was 100% *Dermatophagoides pteronyssinus* administered as a glycerinated solution (SLIT[®], ALK-ABELLO) or adsorbed on aluminium hydroxide (SCIT, ALUTARD[®], SQ, ALK-ABELLO). SLIT was daily self-administered at home, including a 10 days induction phase followed by a maintenance phase. SCIT was administered in the clinic and included a 16 weeks induction phase followed by a monthly maintenance phase. *Successful AIT* was defined by a clinical amelioration of the rhinitis ARIA score after 1 year treatment. As the number of patients was thin, rhinitis severity was categorized as intermittent to mild persistent and moderate to severe persistent rhinitis.

ELISpot assay

Blood samples were collected in citrate phosphate dextrose adenine (CPDA)-pretreated blood collection tubes. They were stored at room temperature and processed within 24 hours following collection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation. Ninety-six well PVDF (Millipore) plates were permeabilized for 1

minute using 35% ethanol, washed five times with PBS and coated overnight at 4° C with antibodies to interleukin (IL)-4, IL-10, IL-13 or IFN γ following the manufacturer's instructions (U-Cytech, Utrecht, The Netherlands). Then, the plates were incubated for 1 hour at 37°C with blocking solution and washed 3 times with PBS. PBMC were resuspended in culture medium (RPMI 1640 from Invitrogen containing L-glutamin and supplemented with Penicilline, streptomycine and 10% fetal calf serum) and added at 0.3×10^6 per well in triplicates to coated plates (except for IL-10) together with HDM (from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. pter*) or phytohemagglutinine as positive control (PHA, 10 μ g/ml, DIFCO) or medium alone as negative control. Before adding PBMC to IL-10 coated plates, CD14⁺ cells depletion was performed with BD IMagTM anti-human CD14 magnetic particles in order to deplete CD14⁺ monocytes and macrophages that are IL-10 secreting cells. FACS analysis showed that 99% cells were CD14⁻ after depletion.

HDM extract was obtained from Stallergene, France, at a concentration corresponding to 20 μ g/ml Derp 1, a major allergen of *Dermatophagoide pteronyssinus*.

After culture for 20 hours at 37°C, the cells were removed by extensive washing, and a secondary antibody to IFN- γ , IL-4 or IL-13 (U-Cytech) was added and incubated for 1 hour at 37°C. After extensive washing of both sides of the plate, GABA (phi-labeled anti-biotin antibodies) conjugate (U-Cytech) was added for 1-hour at 37°C°. After another series of washings, ActivatorI+II was added to visualize spots. The reaction was stopped 25 minutes later by washing with water and plates were air-dried for 1 hour before spot counting using an ELISpot reader (Autoimmun Diagnostika, Strassberg, Germany).

All data shown are means of triplicate wells and expressed as spot-forming cells per 0.3×10^6 PBMC.

Flow cytometry

Flow cytometry was performed on PBMC cells to assess the numbers of CD4⁺Foxp3⁺T-cells. Staining for CD127 and CD25 was also performed to distinguish Treg cells (CD127^{lo}CD25^{hi}) from recently activated effector T-cells (CD127^{hi}CD25⁺).

Cell surface staining was performed with CD4-PerCP, CD25-APC and CD127-FITC (BD Biosciences). Intracellular staining was performed to identify Foxp3⁺ cells using Foxp3-PE (eBioscience) and the intra-cellular staining kit according to the manufacturer instructions. FACS analysis was done using FACS Canto II: first, Foxp3⁺ cells were identified among the CD4⁺ T-cells population. Secondly, within the CD4⁺Foxp3⁺ population, CD127^{lo}CD25^{hi} Tregs cells were distinguished from CD127^{hi}CD25⁺ recently activated effector T-cells. Absolute count of lymphocytes was estimated using BD-True Count[®] system.

Total and specific IgE levels

Serum levels of total immunoglobulin E (IgE) and specific antibodies (IgE, IgG4) against *Dermatophagoide pteronyssinus* were determined in whole blood using the immunoCAP-System (Thermo Fischer, Uppsala, Sweden).

Statistical analysis

Graphic display and statistical analysis were performed using GraphPad Prism software. Data are expressed as means and standard deviation (SD). Quantitative data (immunologic parameters) were compared using Mann-Whitney U tests for continuous skewed data and using Fisher's exact test for categorical data. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used for paired tests. P-values < 0.05 were considered statistically significant for all analyses.

RESULTS

Clinical efficacy of allergen-specific immunotherapy

After 1 year SLIT, 9 children (60%) had a clinical amelioration (successful SLIT, S-SLIT group). In 6 children, SLIT was unsuccessful (U-SLIT group). In the group treated with SCIT, 10 had a clinical amelioration (83%, SCIT group). Clinical and biological characteristics are detailed in table I and II.

HDM-specific Th2 cells

As it was shown in recent publications, antigen-specific Th2 cells decrease with tolerance induction. Hence, we compared the number of circulating HDM-specific IL-4 and IL13 secreting T-cells at day 0 and after 6 and 12 months AIT, and between both S-SLIT and U-SLIT groups.

In the S-SLIT group, as shown in figure 1a, we found that the number of HDM-specific IL-4 secreting T-cells significantly decreased at 6 and 12 months after AIT ($p=0.05$ and 0.02 respectively, unpaired comparison). Similar results were found with IL-13 responses (Figure 1a). At variance, in the U-SLIT group, no significant decrease was observed in the frequency of both HDM-specific IL-4 and IL-13 secreting T-cells.

Furthermore, after 12 months from AIT, the number of HDM-specific IL-4 and IL13 secreting T-cells was lower in the S-SLIT than in the U-SLIT ($p=0.04$ for IL-4 and $p=0.09$ IL-13, figure 1b).

Surprisingly, after 6 or 12 months SCIT, no significant decrease in allergen-specific Th2 cells was observed.

HDM-specific IFN γ secreting Th1 cells

AIT was described to induce antigen-specific IFN γ secretion although results are conflicting.

In our study, we couldn't detect any HDM-specific IFN γ secreting T-cells at day 0 and after 6 or 12 months AIT neither in the S-SLIT group nor in the SCIT group.

HDM-specific IL-10-secreting cells

We also quantified HDM-specific IL-10 secreting T-cells, known as Tr1, and found an increase after 6 months AIT in the S-SLIT group ($p=0.03$, paired) but not after 12 months anymore ($p=0.2$, paired) (figure 2). Such an increase was not found in the U-SLIT group ($p=0.6$ at 6 months). Moreover, after 6 months of SLIT, the number of HDM-specific IL-10 secreting T-cells tended to be higher in the S-SLIT group than in the U-SLIT ($p=0.08$).

No significant changes were found concerning IL-10 secreting T-cells in the SCIT group.

CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells

As shown in figure 3a, after 12 months SCIT, the number of CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}Foxp3⁺ T-cells named Foxp3⁺Tregs was increased ($p=0.006$). No change in the number of CD4⁺Foxp3⁺ T-cells was found ($p=0.3$), showing that this increase is not due to an activation of the CD4⁺ T-cells population but rather to an increase of the Foxp3⁺ Tregs. Furthermore, after 12 months AIT, the number of circulating Foxp3⁺ Tregs was higher in the SCIT group as in the S-SLIT group ($p=0.02$) (see figure 3b). In this S-SLIT group, we didn't find any Foxp3⁺ Tregs increase after 12 months SLIT ($p=0.6$).

HDM-specific IgE and IgG4

After 6 months ITA, total IgE and D. pter specific IgE were increased in the S-SLIT group ($p=0.008$ et $p=0.049$). In parallel, D. pter specific IgG4 increased ($p=0.03$). However, differences with the U-SLIT group were not significant. As for the SCIT group, Der p 1 increased after 6 months ($p=0.02$) and a tendency to increase was found in total IgE after 6 months ($p=0.06$) and D. pter specific IgG4 after 12 months ($p=0.06$).

DISCUSSION

Dans cette étude nous avons évalué en parallèle l'efficacité clinique et différents paramètres immunologiques chez des enfants asthmatiques allergiques aux acariens soumis à un traitement de désensibilisation par voie sous-cutanée ou sublinguale. Parmi les paramètres immunologiques nous nous sommes tout particulièrement intéressés à la quantification des cellules Th2 spécifiques d'acariens circulantes, les lymphocytes pathogènes, ainsi qu'à la détection de deux sous-populations de lymphocytes régulateurs à savoir, les lymphocytes Tr1 et les lymphocytes régulateurs $CD4^+CD25^+FoxP3^+$.

Comme décrit de manière détaillée dans le tableau I, au terme de un an de suivi, les deux formes d'immunothérapie, sous-cutanée (SCIT) et sublinguale (SLIT) se sont révélées efficaces dans 83% et 60% respectivement des patients traités. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés dans d'autres études de la littérature (255). Il est important de noter que la sévérité clinique de l'asthme allergique était plus importante chez les enfants traités par SCIT que chez ceux traités par SLIT, selon les habitudes du service où étaient suivis les patients.

Concernant le suivi immunologique, l'observation remarquable est que le profil observé diffère chez les patients traités par désensibilisation sous-cutanée ou sublinguale. Bien entendu le fait que la sévérité de la maladie diffère dans les deux groupes, comme nous venons de le dire, peut avoir un effet sur cette observation, il n'en reste pas moins que jusque là, très peu d'étude a comparé ces deux types d'immunothérapie côte à côte pour ce qui est de l'évolution des paramètres immunologiques (150,256,257).

Ainsi, trois observations intéressantes se dégagent de nos résultats :

- 1) les lymphocytes Th2 spécifiques d'acariens ont diminué de manière significative après une immunothérapie spécifique sublinguale efficace,

- 2) cette diminution des lymphocytes pathogènes est allée de pair, dans ce groupe de patients, avec une augmentation du nombre des cellules productrices d'IL-10,
- 3) les lymphocytes $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ circulants ont augmenté de manière significative chez les patients traités par désensibilisation sous-cutanée.

Concernant la détection des lymphocytes Th2 nous avons utilisé une technique que nous avons mise au point qui consiste en un test ELISpot pour détecter la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 après une incubation courte (environ 20 heures) en présence de l'allergène. Au cours de ces dernières années, différentes techniques ont été utilisées pour la détection des lymphocytes Th2 spécifiques d'allergènes (dont l'analyse de cytokines produites après culture dans des surnageants, l'analyse de cytokines intra-cytoplasmiques, l'utilisation de tétramères) qui ont été revues de manière critique dans un travail récent (120). L'intérêt de l'ELISpot que nous avons utilisé est qu'il permet une analyse *ex vivo* des cellules d'intérêt quasiment en temps réel et reflète donc bien le nombre de cellules activées, éventuellement mémoire, présentes chez l'individu. Par ailleurs, l'utilisation de l'antigène sous forme non purifiée permet l'identification de lymphocytes spécifiques de différents épitopes de l'allergène. Enfin, par rapport aux tétramères grâce à ce test il est possible d'analyser tous les individus indépendamment de leur haplotypes HLA.

Il est intéressant, pour mieux situer nos résultats dans le contexte de la littérature, de se référer au Tableau A présenté plus loin à la page 172 dans la discussion de ce manuscrit. Ce tableau résume les paramètres immunologiques principaux qui ont été rapportés dans différentes études décrivant des protocoles de désensibilisation par voie sous-cutanée ou sublinguale. Il apparaît alors clairement que lorsqu'il s'agit du suivi des lymphocytes Th2 spécifiques d'allergène une comparaison stricte des résultats est difficile du fait de la diversité des techniques utilisées. Néanmoins, bon nombre d'entre eux décrivent une diminution des

lymphocytes à potentiel Th2 après désensibilisation mais, ce qui est flagrant, est que cette diminution est toujours relativement tardive (à 6, 12 mois, voire plus tard après la désensibilisation) sauf pour un travail, publié déjà il y a quelque temps, concernant la désensibilisation sous-cutanée aux acariens où un effet a été observé à 2 mois (94). Nos résultats montrent qu'une diminution significative du nombre de lymphocytes Th2 après désensibilisation sublinguale a été observée clairement à 6 mois et persiste à 12 mois après le traitement. La diminution est observée pour les lymphocytes producteurs d'IL-4 et aussi ceux producteurs d'IL-13. A l'heure actuelle des analyses complémentaires sont en cours pour analyser la présence de cellules produisant à la fois les deux cytokines. N'ayant pas effectué d'analyses de suivi plus précoces nous ne pouvons pas conclure avec précision sur le profil de cette diminution dans le temps. Il s'agit là d'études que nous voulons poursuivre car l'enjeu est évident, à savoir, pouvoir conclure sur l'utilité du suivi des lymphocytes Th2 spécifiques d'allergène dans le suivi clinique de la désensibilisation à court et à long terme. Ceci est d'autant plus relevant que le type de technique utilisée peut être déterminant. Ainsi, le travail récent de M. Bonvalet et coll. (258) qui ont utilisé, chez des patients désensibilisés par voie sublinguale, différentes techniques pour détecter les lymphocytes Th2 spécifiques (y compris l'utilisation de tétramères) ne voit aucune capacité prédictive de l'efficacité du traitement à 2 et 4 mois.

Très intéressant nous semble le fait que, toujours après désensibilisation sublinguale, la diminution du nombre de lymphocytes Th2 observée corrèle avec l'efficacité clinique du traitement. Bien qu'elle reste, bien évidemment, à confirmer sur un plus grand nombre de patients et au sein d'un protocole permettant de valider cette capacité pronostique du test ELISpot, il s'agit là d'un résultat qui n'a jamais été rapporté (voir tableau A). L'exemple peut-être le plus proche d'un test immunologique qui ait montré la capacité de suivre le « statut » de sensibilisation d'un individu vis-à-vis de l'allergène concerne le cas particulier

des piqûres d'abeilles où le suivi des lymphocytes producteurs d'IL-10 (régulateurs), et non pas celui des lymphocytes Th2, variait avec la saison d'exposition (43,155).

Qu'advient-il des lymphocytes Th2 qui diminuent fortement après désensibilisation jusqu'à disparaître totalement chez certains patients, et ce, de manière semble-t-il très durable ? En effet, nous avons eu la possibilité d'analyser un très faible nombre d'individus à trois ans après une désensibilisation sublinguale efficace chez qui les lymphocytes Th2 spécifiques d'acariens demeuraient totalement indétectables. Les données actuelles de la littérature proposent que l'allergène introduit au cours de la désensibilisation va promouvoir d'une part une apoptose progressive des lymphocytes pathogènes Th2 présents à des stades terminaux de leur différenciation (dont certains travaux montrent qu'ils sont CD27⁺) (126). D'autre part, sans que l'on sache si cela se produit de manière concomitante ou consécutive, il est proposé que l'apoptose des lymphocytes Th2 favorise l'expansion des lymphocytes Th1/Tr1 présents dans l'environnement producteurs respectivement d'IFN γ et d'IL-10 d'où la résolution de l'inflammation allergique qui peut-être très durable puisqu'il s'agit là, du point de vue immunologique, de phénomènes bien connus permettant la restauration d'une tolérance immunitaire vis-à-vis de l'allergène et la constitution au niveau de l'organe cible d'une situation de privilège immunitaire. Nos résultats sont tout à fait compatibles avec un tel scénario puisque l'on a observé, toujours avec la méthode ELISpot après une courte stimulation par l'allergène, une augmentation significative des lymphocytes producteurs d'IL-10 dès 6 mois chez les patients ayant suivi une désensibilisation sublinguale qui s'est avérée cliniquement efficace. En revanche, nous n'avons jamais pu détecter la présence de lymphocytes de type Th1, producteurs d'IFN γ . Nous cherchons à l'heure actuelle à mieux caractériser ces lymphocytes régulateurs Tr1 producteurs d'IL-10. Jusque-là, la tâche n'était pas simple techniquement puisque l'on ne possédait pas de marqueurs de surface permettant de suivre facilement et surtout de trier ces lymphocytes Tr1. Très récemment, le groupe de

M.G. Roncarolo et coll. a décrit qu'aussi bien chez l'homme que chez la souris l'expression conjointe de CD49b et de LAG-3 permet d'identifier de manière fiable les lymphocytes Tr1 au sein de la population CD4⁺ (47). Des analyses sont en cours utilisant ces marqueurs qui nous permettront peut-être d'affiner l'analyse des lymphocytes producteurs d'IL-10 chez les patients traités par immunothérapie sublinguale.

A ce point il nous faut discuter un autre résultat de notre étude qui nous semble très intéressant, bien que déroutant, à savoir, le fait que le profil immunologique chez les patients ayant subi une désensibilisation sous-cutanée efficace diffère totalement de celui que nous venons de décrire pour la désensibilisation sublinguale. Deux éléments majeurs sont à noter. Ainsi, chez les patients traités par désensibilisation sous-cutanée, nous n'avons pas observé ni diminution significative des lymphocytes Th2 spécifiques d'acariens ni augmentation des lymphocytes Tr1 producteurs d'IL-10. En revanche, une augmentation significative de la fréquence et de la valeur absolue des lymphocytes régulateurs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ circulants est apparue tardivement à 12 mois après désensibilisation. Dans ce cas nous pouvons préciser que l'apparition de cette sous-population est tardive puisque l'analyse à 6 mois, chez les mêmes patients, n'a pas montré de différence. L'augmentation des lymphocytes régulateurs FoxP3⁺ semble assez bien corrélée à l'issue clinique favorable du traitement. Il est important de souligner que nous n'avons jamais retrouvé d'augmentation de cette sous-population de lymphocytes régulateurs chez les patients traités par désensibilisation sublinguale.

Comment expliquer l'apparent « manque » d'effet de la désensibilisation sous-cutanée sur les lymphocytes Th2 pathogènes malgré l'effet clinique évident chez plus de 80% des patients analysés ? Plusieurs possibilités peuvent être évoquées. Tout d'abord, comme nous l'avons déjà dit plus haut, les patients se distinguent de ceux traités par désensibilisation sub-linguale par leur présentation clinique plus sévère. Ceci suggère peut-être une différence « qualitative » du processus inflammatoire local avec des lymphocytes Th2 certes en fin de

différentiation mais, cette fois ci, pour des raisons qui nous restent à élucider, plus résistants à l'apoptose. Nous voudrions effectuer des études comparatives de transcriptome sur les lymphocytes Th2 des patients traités par les deux formes d'immunothérapie afin de comparer l'expression des voies de signalisation pro- et anti-apoptotiques. Une deuxième possibilité concerne la migration des différentes sous-populations de lymphocytes dans l'environnement local qui expliquerait que les cellules pathogènes ne sont éliminées que partiellement et que celles qui demeurent présentes se concentrent plutôt à la périphérie. Là encore les études de transcriptome devraient nous aider à identifier le profil différentiel (par les cellules Th2 des patients traités par les deux formes d'immunothérapie) des récepteurs de chimiokines et des molécules d'adhésion.

Enfin concernant les lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺ une question importante se pose : appartiennent-ils à la sous-population adaptative, comme semble le suggérer certaines données de la littérature, ou sont-ils des lymphocytes T régulateurs naturels originaires du thymus. La seule manière de répondre à cette question est d'analyser la méthylation de régions sensibles du gène FoxP3⁺ (259,260). Pour ce faire nous avons débuté une collaboration avec H.D. Volk (Hôpital de la Charité, Berlin) pour étudier les cellules des patients inclus dans cette étude et dont nous avons conservé une partie congelée.

En conclusion, nous souhaitons poursuivre nos études d'une part, en les étendant à un plus grand nombre de patients et, d'autre part, en réalisant des études cellulaires et moléculaires plus fines qui nous permettront :

- 1) de confirmer de manière plus nette les résultats prometteurs que nous avons obtenus sur le caractère prédictif/pronostic de certains marqueurs lymphocytaires et,

2) d'approfondir certaines caractéristiques physiopathologiques plus fondamentales des lymphocytes pathogènes et régulateurs au cours de désensibilisations spécifiques cliniquement efficaces.

Table I Clinical and biological characteristics of patients treated with allergen-specific immunotherapy

| | gender | age | Asthma severity | Rhino conjunctivitis severity | AI T | AIT succes* |
|----|--------|------|-----------------|-------------------------------------|---------|----------------|
| 1 | 1 | 8,5 | ++ | ++ | SL | 1 |
| 2 | 1 | 14,2 | ++ | ++ | SL | 1 |
| 3 | 1 | 9,3 | + | ++ | SL | 1 |
| 4 | 1 | 7,2 | ++ | ++ | SL | 1 |
| 5 | 2 | 12 | ++ | + | SL | 1 |
| 6 | 1 | 7,5 | ++ | ++ | SL | 1 |
| 7 | 2 | 7,2 | + | + | SL | 1 |
| 8 | 1 | 7,5 | ++ | + | SL | 1 |
| 9 | 1 | 12,5 | ++ | ++ | SL | 1 |
| 10 | 2 | 11,4 | ++ | + | SL | 2 |
| 11 | 2 | 7,2 | ++ | + | SL | 2 |
| 12 | 1 | 8,4 | + | + | SL | 2 |
| 13 | 1 | 7,8 | ++ | + | SL | 2 |
| 14 | 1 | 7 | + | + | SL | 2 |
| 15 | 1 | 5,6 | +++ | + | SL | 2 |
| 16 | 1 | 7,9 | ++ | ++ | SC | 1 |
| 17 | 1 | 14,4 | +++ | + | SC | 1 |
| 18 | 2 | 15,1 | + | ++ | SC | 2 |
| 19 | 1 | 12,2 | +++ | ++ | SC | 1 |
| 20 | 1 | 8,1 | +++ | ++ | SC | 1 |
| 21 | 1 | 9,3 | ++ | ++ | SC | 1 |
| 22 | 1 | 7,4 | +++ | ++ | SC | 1 |
| 23 | 2 | 13,7 | +++ | + | SC | 2 |
| 24 | 1 | 6,4 | +++ | ++ | SC | 1 |
| 25 | 1 | 8,4 | +++ | ++ | SC | 1 |
| 26 | 2 | 14,7 | +++ | ++ | SC | 1 |
| 27 | 2 | 15,3 | +++ | ++ | SC | 1 |

* 1 : Successful immunotherapy

2 : Unsuccessful immunotherapy

Table II Clinical and biological characteristics of the 3 different groups on day 0, before AIT. Values are given as mean (standard deviation) except if differently notified.

| | S-SLIT | U-SLIT | SCIT |
|--|-------------|------------|-----------|
| n | 9 | 6 | 10 |
| Male/female | 7/2 | 4/2 | 8/2 |
| age | 10 (3) | 7 (8) | 10 (3) |
| Controlled with high doses ICS asthma (n) | 0 | 1 | 5 |
| Moderate to severe/intermittent to mild persistent rhinitis (n) | 6/3 | 0/6 | 9/1 |
| Total IgE (KU/L) | 271 (168) | 382 (387) | 367 (295) |
| D. pter IgE (KU/L) | 29 (27) | 49 (35) | 49 (38) |
| Der p 1 IgE (KU/L) | 20 (29) | 34 (37) | 33 (36) |
| D. pter IgG4 (mgA/L) | 0.39 (0.27) | 0.3 (0.25) | 4 (10) |
| HDM-specific IL-4 secreting T-cells / 0.3 M PBMC | 47 (30) | 21 (23) | 40 (53) |
| HDM-specific IL-13 secreting T-cells | 35 (26) | 22 (17) | 43 (52) |
| HDM-specific IL-10 secreting T-cells / 0.3 M PBMC | 118 (141) | 118 (231) | 243 (326) |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺ T-cells 10 ⁶ /mL (n) | 47 (26) | 14 (7) | 34 (15) |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺ T-cells 10 ⁶ /mL (%) | 5.2 (2.5) | 2.5 (1.6) | 4.2 (2.3) |

Legends to the figures

Figure 1

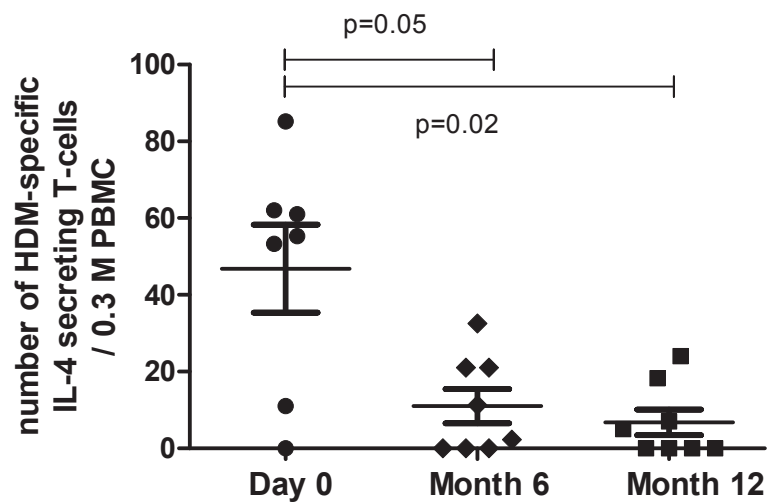
Diagram representation of the number of circulating HDM-specific IL-4 or IL-13 secreting T-cells. 1a. S-SLIT group at day 0 and after 6 and 12 months AIT 1b. Comparison of S-SLIT and U-SLIT group after 12 months AIT 1c. SCIT group at day 0 and after 6 and 12 months AIT 1d. Transversal data after 3 years of SCIT and SLIT. Data are shown as mean with SEM.

Figure 2

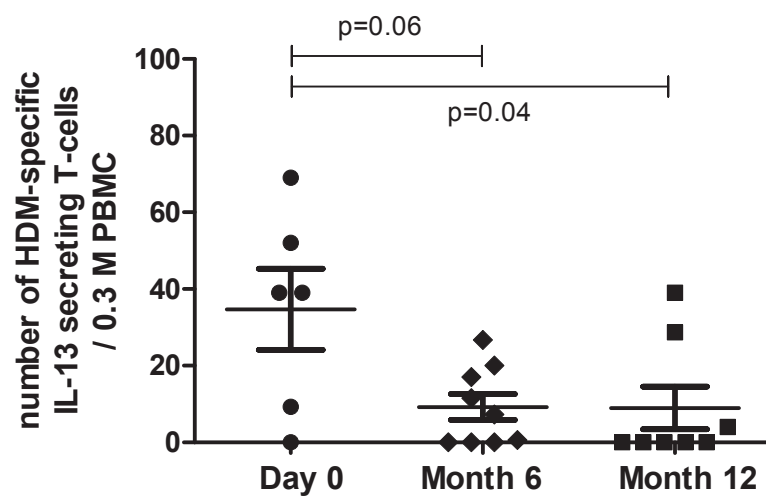
Diagram representation of the number of circulating HDM-specific IL-10 secreting T-cells (Tr1) in the S-SLIT group at day 0 and after 6 and 12 months AIT. Data are shown as mean with SEM.

Figure 3

Diagram representation of circulating $CD4^+CD25^+CD127^loFoxp3^+$ T-cells. 3a. SCIT group at day 0 and after 6 and 12 months AIT. 3b. comparison between the SCIT and the S-SIT groups at day 0 and after 12 months AIT. Data are shown as mean with SEM.



S-SLIT



S-SLIT

Figure 1a

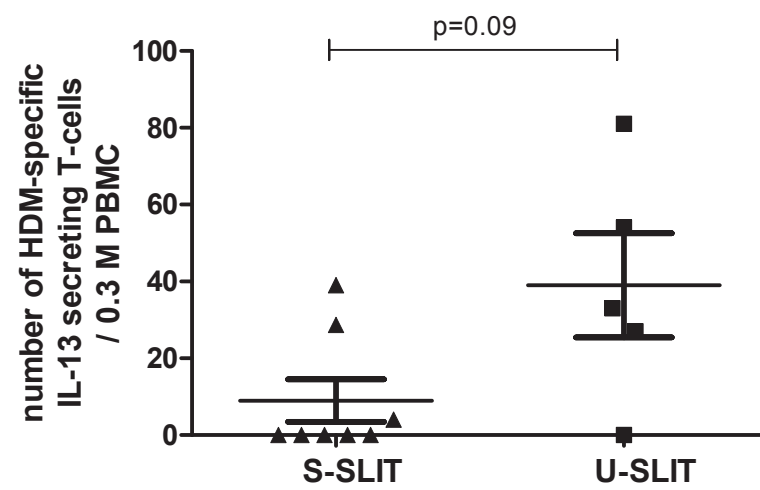
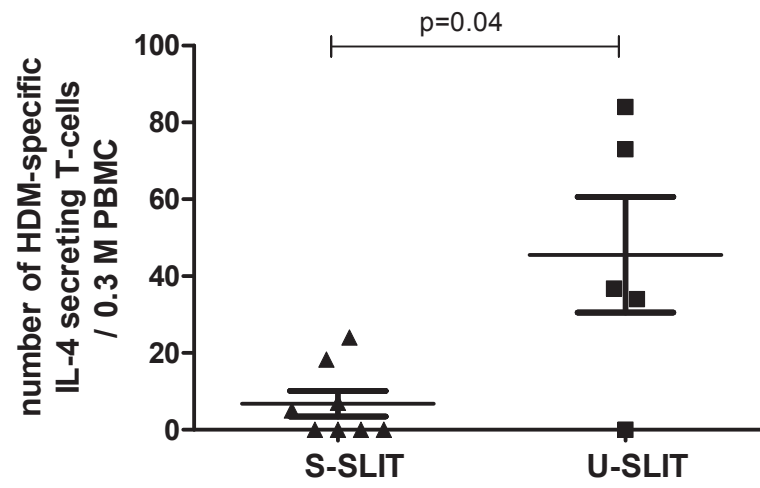


Figure 1b

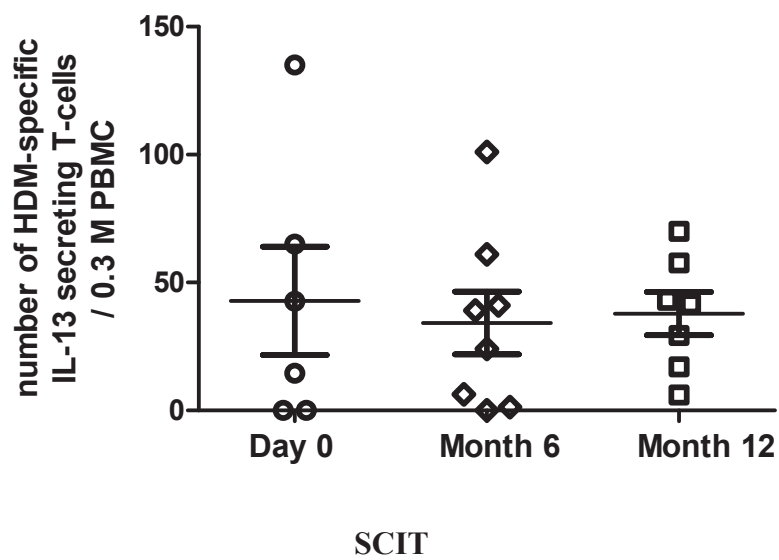
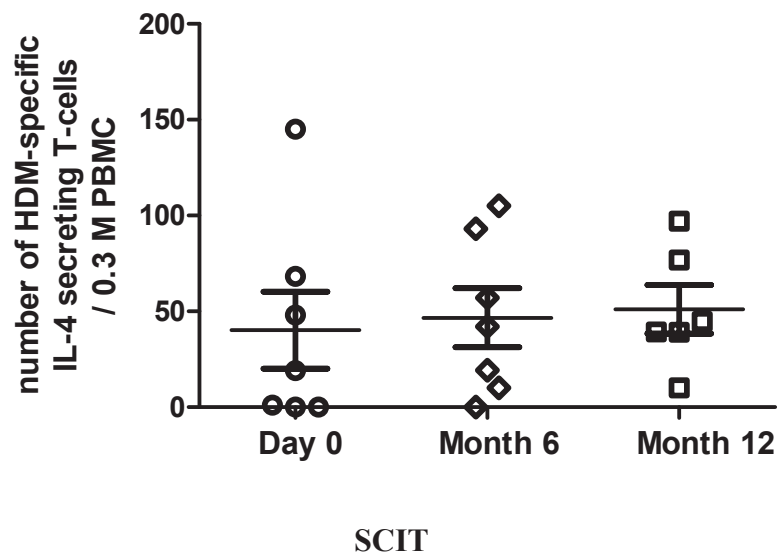


Figure 1c

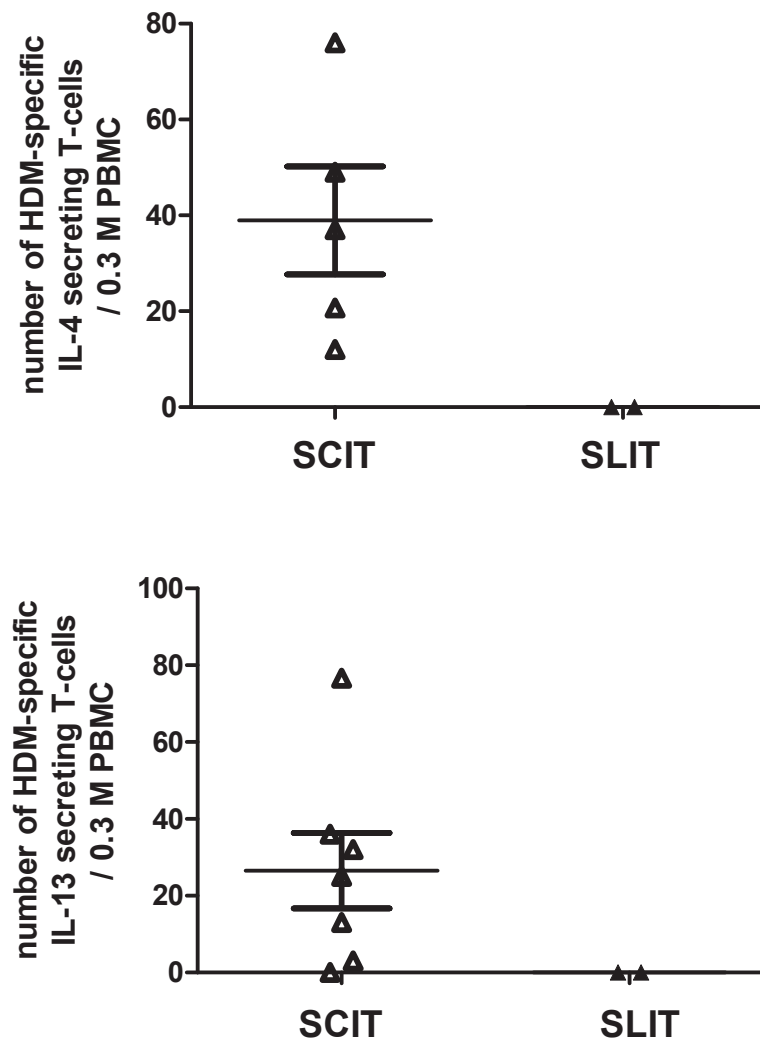


Figure 1d

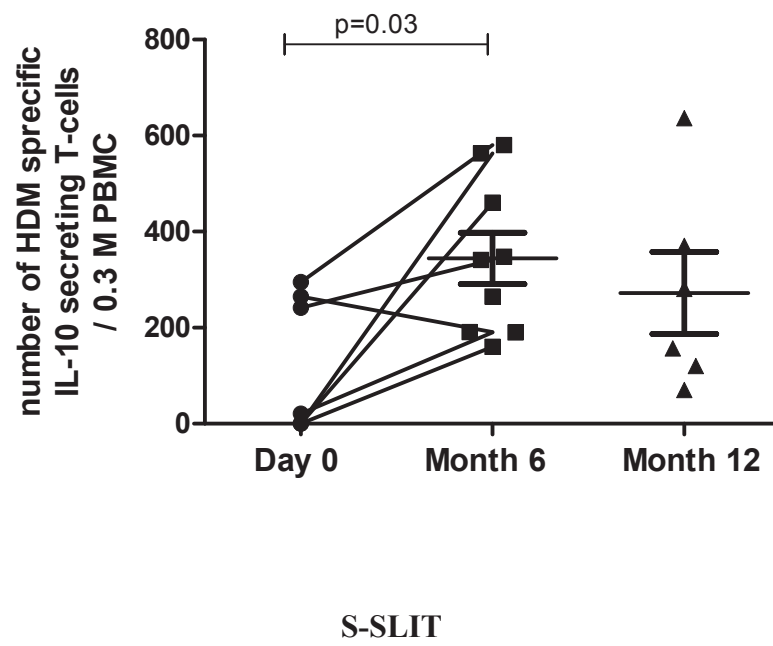
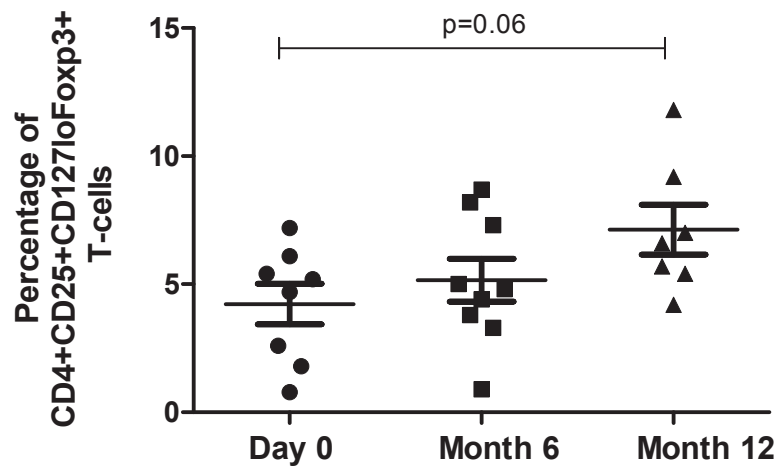
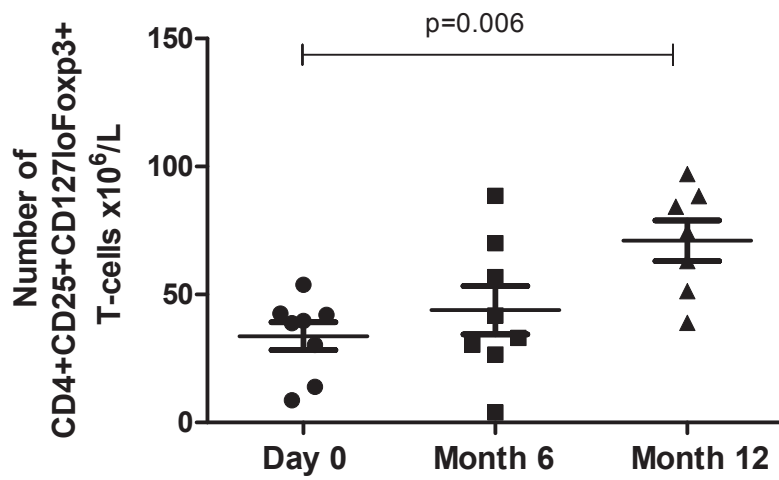


Figure 2



SCIT



SCIT

Figure 3a

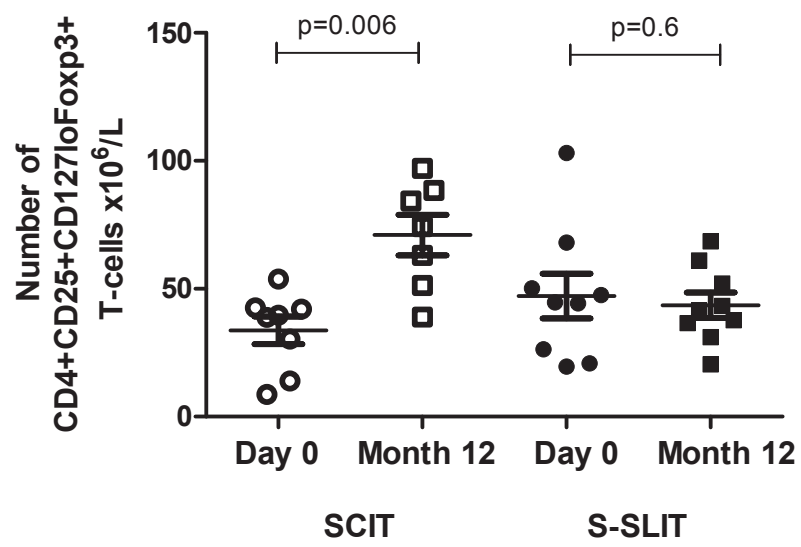


Figure 3b

DISCUSSION

A ce point de notre travail, il nous semble intéressant de discuter quelques questions fondamentales sur le plan physiopathologique et clinique en les confrontant à nos résultats et à ceux de la littérature.

Quelle place attribuer à l'étude des cellules Th2 ex vivo dans le diagnostic de l'allergie ?

Sur le plan immunologique

Nous avons montré dans deux articles que la quantification des lymphocytes Th2 circulants spécifiques d'allergène permettait de diagnostiquer l'allergie aux acariens et au lait de vache dans une population d'enfants allergiques.

Il a déjà été décrit que l'étude de la réponse lymphocytaire T spécifique d'allergène permettait de différencier les sujets allergiques des non-allergiques. Différentes techniques d'étude ont été utilisées et différentes populations ont été étudiées.

Chez des sujets sensibilisés aux acariens, au bouleau ou à la noisette, la fréquence des cellules T sécrétant de l'IL-4 en réponse à l'allergène est supérieure à celle retrouvée chez des sujets sains non sensibilisés. Cette fréquence a été décrite par la méthode ELISpot et par le Cytokine Secretion Assay® (42). De même, en réponse aux extraits d'acariens ou de pollens de graminées, on observe une augmentation de la prolifération lymphocytaire T et de la sécrétion d'IL-4, IL-5 et IL-13 chez les sujets asthmatiques sensibilisés aux acariens comparés aux non sensibilisés (261–264). De façon intéressante, il a été décrit un lien entre la réponse lymphocytaire T et la symptomatologie clinique. La sécrétion d'IL-5 en réponse à un extrait d'acariens en culture est plus importante chez un patient sensibilisé présentant des symptômes d'asthme ou de rhinite qu'un patient sensibilisé non symptomatique (263). Il a également été montré que la sécrétion d'IL-5 en réponse à un extrait d'acariens en culture est augmentée

chez les patients sensibilisés aux acariens et répondant à un test de provocation bronchique vis-à-vis de l'antigène, comparés aux patients sensibilisés n'ayant pas répondu et aux patients non sensibilisés. La sécrétion d'IL-5 était aussi corrélée à l'intensité de l'hyperréactivité bronchique alors qu'elle ne l'était pas au taux d'IgE spécifiques (265).

Plus récemment le développement de tétramères de molécules de classe II a permis de détecter les lymphocytes T $CD4^+$ par leur récepteur T spécifique d'un épitope allergénique et de les quantifier (126,155,171,266). Cependant, l'utilisation de ces tétramères se fait souvent après une expansion cellulaire en culture d'au moins 10 jours. Dans l'allergie au pollen de bouleau comme au pollen d'aulne, on retrouve chez les patients allergiques des lymphocytes $CD4^+$ spécifiques d'allergène comme chez les individus non allergiques. La fréquence est plus élevée chez les patients allergiques que chez les individus sains. Le type de lymphocytes $CD4^+$ varie. Chez les patients allergiques, les lymphocytes $CD4^+$ sont sécréteurs d'IL-5 principalement alors que chez les individus sains, ils sécrètent principalement de l'IL-10 et de l'IFN γ . Par ailleurs, chez les patients allergiques, il existe une population de lymphocytes $CD4^+CD27^-$ qui correspond à un statut de différenciation terminale, alors que chez les individus sains, la population $CD4^+CD27^+$ est prépondérante (171,126).

Dans l'allergie alimentaire, le rôle des lymphocytes Th2 a aussi été souligné dans plusieurs études. Les lymphocytes T extraits de la muqueuse gastro-intestinale d'enfants allergiques aux protéines de lait de vache (PLV) prolifèrent plus et produisent plus d'IL-13 en réponse aux PLV que ceux provenant d'enfants non allergiques (212). Les lymphocytes T circulants prolifèrent également plus en réponse aux PLV et produisent plus d'IL-4 chez les enfants allergiques (214,267,268). L'étude des modifications immunologiques lors de protocoles de désensibilisation confirme ces observations en montrant une diminution de la prolifération des lymphocytes T en présence de PLV et la diminution de production des cytokines Th2 IL-4 et

IL-13 chez les enfants devenus tolérants au lait de vache (269). Des observations similaires ont été réalisées dans l'allergie à l'arachide (270–272).

Par ailleurs, l'utilisation de tétramères spécifiques d'arachide 1, un allergène majeur de l'arachide, a permis de détecter des lymphocytes CD4⁺ en quantité 9 fois plus importante chez les sujets allergiques que chez les sujets non allergiques (129).

L'étude de la réponse lymphocytaire T semble donc appropriée au diagnostic de l'allergie. La particularité de notre approche a été d'utiliser d'une part la technique de l'ELISpot réalisée sur un temps court de stimulation (18 heures) et, d'autre part, de distinguer, au sein des individus sensibilisés, les individus sensibilisés symptomatiques des individus sensibilisés non symptomatiques. Cette technique permet de réaliser une étude qualitative et semi-quantitative des lymphocytes CD4⁺ de façon rapide. La durée de 18 heures correspond au temps qu'il faut au lymphocyte T pour sécréter les cytokines en réponse à l'allergène avant de commencer à proliférer. Le résultat indique la fréquence chez un individu des lymphocytes T auxiliaires de type 2 (qui sécrètent de l'IL-4 ou de l'IL-13) spécifiques de l'allergène donné.

Sur le plan pratique, l'intérêt de cette technique est qu'elle est rapide, pour un test fonctionnel, comparé aux cultures souvent plus longues. Elle est plus simple à réaliser que l'utilisation de tétramères de classe II. Ces derniers sont plus difficiles à mettre au point que les tétramères de classe I car ils sont moins stables. L'utilisation des tétramères est restreinte par le CMH du patient et ils permettent d'explorer les réponses cellulaires T à certains peptides uniquement (alors que nous utilisons un extrait d'acariens comprenant l'ensemble des allergènes ou la caséine entière). De ce fait, tous les patients ne peuvent être explorés. Enfin, à notre connaissance, aucune étude n'a décrit la sensibilité et la spécificité de ce test dans le diagnostic de l'allergie.

L'unique autre test fonctionnel décrit est le test d'activation des basophiles. Ce test consiste à étudier en cytométrie de flux l'expression des molécules CD63 et CD203c suite à l'activation du basophile in vitro par l'allergène. Le contact avec l'allergène induit un pontage ou « cross-linking » des récepteurs FcεRI et l'exocytose des granules. La molécule CD63 est alors exprimée à la membrane et l'expression de la molécule CD203c (constitutivement exprimée) augmente (273,274). L'utilité de ce test par rapport au dosage sérique des IgE spécifiques a été montré dans le diagnostic de l'allergie au lait mais dans le cas de l'allergie aux acariens, il ne semble pas supérieur (250,275). La comparaison des résultats de notre technique à ceux du test d'activation des basophiles serait intéressante.

Il nous semble important de confronter l'intérêt de l'analyse des réponses lymphocytaires T dans le diagnostic de l'allergie par rapport au dosage des taux sériques d'IgE et IgG4 spécifiques d'allergènes.

Notre observation suggère que dans l'allergie aux acariens l'étude de la réponse lymphocytaire T reflète plus fidèlement la symptomatologie que le taux sérique des IgE spécifiques. Il a été décrit que chez les patients présentant une rhinite allergique au pollen ou aux acariens, les variations des taux d'IgE spécifiques dans la muqueuse nasale sont corrélées à l'exposition allergénique contrairement au taux d'IgE sériques (276,277). Par ailleurs, plus récemment, l'étude des patients présentant une rhinite allergique dite idiopathique a permis de décrire une production d'IgE spécifiques locales au niveau de la muqueuse nasale alors qu'il n'y avait aucun stigmate d'atopie en périphérie (278,279). Ainsi, la mesure du taux sérique d'IgE spécifiques ne serait donc pas le reflet fidèle du processus physiopathologique au niveau de la muqueuse respiratoire.

Dans l'allergie au lait, le taux d'IgE spécifiques sérique reflète également la sensibilisation au lait et non l'allergie au lait. L'intérêt du dosage sérique des IgE spécifiques du lait de vache

ou de la caséine a également été évalué par des courbes ROC : la prédiction du résultat d'un TPO est moins bonne que par les tests fonctionnels tels que le test d'activation des basophiles (249,250). L'étude de la réponse lymphocytaire T est probablement plus proche de la physiopathologie de la réaction allergique *in vivo* que l'étude du taux des IgE sériques qui reflète la sensibilisation. Dans notre étude, nous avons souligné l'intérêt du rapport IgE/IgG4 spécifique de la caséine. L'intérêt porté au dosage des IgG4 spécifiques est de plus en plus grand depuis ces dernières années. Il a été montré qu'une augmentation du taux d'IgG4 était prédictive de l'acquisition de la tolérance dans l'allergie au lait de vache mais il n'y a pas encore eu de consensus sur l'intérêt et l'utilisation de ce rapport en pratique courante (280,280–282).

Sur le plan clinique

Comme nous l'avons déjà décrit, l'allergie est une maladie dont la fréquence est en constante augmentation. Les symptômes sont souvent invalidants avec une altération de la qualité de vie dans l'allergie respiratoire comme dans l'allergie alimentaire. La prise en charge engendre un coût financier important pour la société. Le diagnostic précis de l'allergie nous semble indispensable pour adapter au mieux la prise en charge et notamment la mise en route d'une Immunothérapie spécifique d'allergène.

Dans l'allergie alimentaire, sous-diagnostiquer une allergie ou porter le diagnostic d'allergie alimentaire à outrance sont toutes les deux des situations qui peuvent engendrer un danger pour le patient. La méconnaissance d'une allergie alimentaire expose au risque d'anaphylaxie et de décès lors de l'ingestion d'un aliment pour lequel les mécanismes de tolérance normalement en place n'existent pas. A l'inverse, porter le diagnostic d'allergie alimentaire à outrance conduit à une prise en charge médicale lourde et au risque de développer une allergie « vraie », alors qu'il n'y avait initialement qu'une sensibilisation. En pratique, la présence

d'IgE spécifiques d'un aliment associée à un TCA positif pour cet aliment signe une sensibilisation à cet allergène. Une grande partie des nourrissons est sensibilisée au lait de vache ou à l'arachide mais seulement une petite fraction de ces enfants développe des symptômes d'allergie à l'ingestion de l'aliment (202,240). Pour différencier les enfants sensibilisés des enfants allergiques vrais, seul le test de provocation orale existe actuellement. Il consiste, lors d'une hospitalisation courte, à faire ingérer l'aliment à doses croissantes à l'enfant et à observer la survenue d'une réaction. Si l'enfant développe une réaction de type allergique (signes cutanéomuqueux, digestifs, respiratoires), il est dit allergique. Ce test devrait être réalisé lors du diagnostic si l'histoire clinique n'est pas franche et régulièrement au cours des premières années de vie car l'allergie alimentaire se résout souvent spontanément. Il est fréquent, en pratique courante, que le diagnostic d'allergie soit porté à outrance devant une simple sensibilisation (présence d'IgE spécifiques de l'allergène et de TCA positifs pour l'aliment) ou qu'un diagnostic posé initialement ne soit pas réévalué au cours des premières années de vie. Cette situation est dommageable pour l'enfant et sa famille. Elle implique de réaliser une exclusion stricte de l'aliment et d'avoir toujours à portée de la main de l'adrénaline auto-injectable. C'est là une source d'angoisse chez les parents comme chez l'enfant, qui retentit de façon négative sur la qualité de vie. Par ailleurs, lorsqu'on réalise une éviction stricte de l'allergène on risque de rompre cet état de tolérance et d'induire une allergie alimentaire secondaire qui aurait pu être évitée : l'ingestion régulière de petites quantités d'un aliment chez une personne sensibilisée entretient probablement un état de tolérance vis-à-vis de celui-ci.

Dans l'allergie respiratoire, la présence d'IgE spécifiques et/ou de TCA positifs vis-à-vis d'un pneumallergène ne suffit pas non plus pour porter le diagnostic d'allergie. Une symptomatologie correspondante doit y être associée. Dans l'allergie aux acariens, aux moisissures ou aux phanères d'animaux, on recherche une rhinoconjonctivite perannuelle

souvent associée à un asthme, alors que les symptômes sont saisonniers lors d'une allergie aux pollens de graminées ou de bouleau. L'examen clinique et l'interrogatoire suffisent souvent pour porter le diagnostic d'allergie. Cependant, le nombre de patients polysensibilisés et polyallergiques sévères est de plus en plus fréquent. Ces patients se présentent avec l'association de plusieurs sensibilisations à différents pneumallergènes perannuels et saisonniers. Le traitement symptomatique est souvent lourd (beta 2 mimétiques, anti-leucotriènes, corticostéroïdes, anti-IgE,). Une ITA bien conduite peut dans ce cas être un traitement curatif très efficace. Si l'allergène est bien ciblé, la maladie peut s'améliorer grandement avec une diminution voire un arrêt des traitements symptomatiques (132). Il faut alors savoir attribuer la symptomatologie à l'allergène en cause. La coexistence de plusieurs sensibilisations à différents pneumallergènes perannuels (par exemple aux acariens, aux moisissures, aux blattes ou aux phanères d'animaux) rend difficile l'attribution de la symptomatologie clinique à un unique allergène. Dans ces cas difficiles, le diagnostic précis de l'allergie est très important. Désensibiliser un patient à un allergène qui n'est pas en cause est lourd et coûteux. En revanche, cibler l'allergène en cause pour réaliser une désensibilisation permet encore une fois l'amélioration de la maladie et évite également le développement de nouvelles sensibilisations.

Au total, il ressort de la littérature et de notre travail que l'étude de la réponse lymphocytaire T peut être un atout dans le diagnostic de l'allergie. Il nous semble important de confronter ces résultats aux « gold standards » que sont le test de réactivité bronchique dans l'allergie respiratoire et le test de provocation orale dans l'allergie alimentaire dans des populations plus nombreuses que celles étudiées ici d'une part et dans des groupes d'individus d'âges différents et ayant des maladies de sévérités et de présentations variées d'autre part.

Dans l'allergie alimentaire, il pourrait être intéressant d'étudier l'intérêt d'un score faisant intervenir les résultats de l'étude de la réponse Th2 spécifique et le rapport IgE/IgG4.

Le mécanisme d'immunodéviation Th2/Th1 est-il toujours d'actualité dans l'induction de tolérance spécifique d'allergène chez l'homme ?

Depuis le développement de l'ITA, de nombreuses études ont été réalisées pour essayer de comprendre les mécanismes d'induction de tolérance à l'origine de l'amélioration clinique observée empiriquement. Les expériences réalisées chez la souris offrent des avantages techniques qui permettent d'approfondir l'étude de ces mécanismes. Cependant l'extrapolation des résultats à l'humain n'est pas évidente. A partir des nombreuses études réalisées chez l'homme au cours de protocoles de désensibilisation, il est à ce jour impossible d'expliquer l'induction de tolérance par l'allergène par un unique mécanisme immunologique. Plusieurs raisons sont probablement à l'origine de cette impasse.

Sur le plan clinique, différents types d'allergènes sont étudiés. Les allergènes per-annuels comme les acariens, les moisissures ou les blattes sont à l'origine de symptomatologies différentes des allergènes saisonniers comme le bouleau (étudié dans le nord de l'Europe), le cyprès (dans le sud de l'Europe), le cèdre japonais (en Asie) ou l'aulne (en Amérique du nord). Les immunothérapies sont par conséquent administrées de façon per annuelle pour les acariens ou les moisissures et saisonnière pour les pollens. Par ailleurs, différents modes d'administration de l'allergène sont prescrits : par voie sous-cutanée dans l'allergie aux venins d'hyménoptères ou par voie sublinguale ou sous-cutanée pour les autres allergènes en fonction des pratiques de chaque pays et de chaque clinicien. Enfin, les maladies traitées sont variables, allant de la rhinoconjonctivite monoallergique à l'asthme sévère polyallergique. L'ensemble de ces caractéristiques cliniques peut être à l'origine de variations entre les études. Il est probablement aussi important de considérer l'hétérogénéité des patients dans chacune des populations analysées.

Sur le plan immunologique, la diversité des approches expérimentales est aussi à l'origine de résultats très divergents, comme nous le présentons dans le tableau A. L'évolution des techniques a permis ces dernières années de proposer de nouveaux mécanismes impliqués dans l'induction de tolérance au cours de l'ITA.

En effet, il a longtemps été proposé que l'effet thérapeutique bénéfique de l'ITA reposait sur une immunodéviations Th2/Th1, c'est-à-dire que la réponse à l'allergène initialement polarisée vers un versant Th2 se modifiait au cours de l'ITA en se polarisant plutôt vers un versant Th1. La majeure partie de ces observations était issue de résultats de cultures cellulaires en présence d'allergène pendant un nombre de jours allant de 5 à 14. L'analyse des cytokines était réalisée dans les surnageants de ces cultures par ELISA. Ces analyses étaient souvent complétées par des cocultures et des tests de prolifération (283–285).

Par la suite, il est apparu que certaines cellules suppressives Tr1 sécrétrices d'IL-10 et spécifiques d'allergène, jouaient un rôle important dans l'induction de tolérance. Initialement, l'importance de l'IL-10 a été mise en évidence sur des cultures cellulaires classiques (286). Puis, les marquages de cytokines intracellulaires et la méthode ELISpot (après pré-incubation des cellules avec l'allergène) ont permis d'étayer et de préciser les premières observations (94,149).

Enfin, très récemment, l'étude précise des cellules pathogènes Th2 par la méthode ELISpot puis grâce à l'utilisation des tétramères de classe II a permis de décrire qu'il existe, au cours de l'ITA une suppression des cellules Th2 pathogènes spécifiques d'allergène et de confirmer, que, parallèlement, se développait une population Tr1. En revanche, l'apparition d'une population sécrétrice d'IFN γ reste très discutée voire remise en cause par certains (126,153,171). Ces derniers auteurs proposent des mécanismes de déplétion cellulaire T,

d'induction d'anergie ou d'ignorance cellulaire pour expliquer la suppression des cellules Th2.

Notre étude sur l'induction de tolérance au cours de l'ITA présente plusieurs particularités qu'il nous semble important de souligner, aussi bien sur le plan clinique que sur le plan immunologique, et dont dépend la pertinence des résultats obtenus.

D'une part, il s'agit d'une désensibilisation aux acariens. Celle-ci est moins souvent étudiée que les ITA saisonnières alors que l'allergie aux acariens est très fréquente comme nous l'avons déjà souligné. Par ailleurs, nous avons comparé deux voies d'administration : la voie sous-cutanée et la voie sublinguale. Les études comparant ces deux modes d'administration sont peu nombreuses. Enfin, deux types d'enfants ont été suivis : les enfants ayant un asthme sévère, désensibilisés par voie sous-cutanée et les enfants ayant un asthme léger à modéré, désensibilisés par voie sublinguale.

Sur le plan immunologique, nous avons étudié les cellules *ex vivo* par la méthode ELISpot sans pré incubation avec l'allergène et en utilisant un extrait d'acarien (et pas une protéine).

Nos résultats permettent d'évoquer deux mécanismes d'induction de tolérance. Dans le premier cas (ITA sublinguale), on observe une suppression des cellules Th2 pathogènes spécifiques d'allergène associée à une induction de cellules Tr1 également spécifiques d'allergène. Nous n'avons pas d'argument pour évoquer une déviation Th2/Th1. Dans le deuxième cas (ITA sous-cutanée), les cellules Th2 pathogènes persistent même à long terme bien qu'il y ait une amélioration clinique. Parallèlement, on observe l'apparition d'une population de Treg Foxp3⁺. Bien que nous n'ayons pas d'arguments mécanistiques, il est fort probable qu'un autre mécanisme d'induction de tolérance soit en jeu dans ce deuxième cas. Encore une fois nous n'avons pas d'élément permettant d'évoquer une induction de cellules Th1.

Au total, il semblerait que plusieurs mécanismes d'induction de tolérance soient en jeu dans l'ITA mais que l'immunodéviatio Th2/Th1 ne soit pas aussi évidente que cela avait été décrit dans le passé.

Tableau A. Principales études immunologiques menées au cours des protocoles cliniques d'ITA. Comparaison des résultats en fonction des techniques d'analyse utilisées.

| Références | Type d'ITA | Analyse des cellules suppressives (Tr1/Treg) | | Analyse des cellules effectrices (Th1/Th2) | | Analyse des surnageants (cytokines) | | Remarques |
|--|---|---|---|--|---|---|--|--|
| ITA aux POLLENS | | | | | | | | |
| M. Bonvalet et al. Clin Exp Allergy 2012 (258) | Pollen de graminées SLIT Etude précoce après 2 et 4 mois d'ITA | Marquage sur sg total | pas de modifications des Treg (CD25 ⁺ , CD127 ⁺ , Foxp3 ⁺) | Tétramères de classe II/ Phl p 1 et Phl p 5 Marquage sur sg total | Pas de modification des CD4 ⁺ CD27 ⁺ /CD4 ⁺ CD27 ⁻ corrélée avec l'efficacité pas de modifications des Th1 (CCR5 ⁺ , CXCR3 ⁺) Th2 (CRth2 ⁺ , CCR4 ⁺) | | | Les modifications phénotypiques des cellules Th1/Th2/Treg précoces ne sont pas corrélées à l'efficacité clinique |
| C. Möbs et al. JACI 2012 (153) | Pollen de bouleau SCIT Suivi 5ans (ans d'ITA puis 2 ans post ITA) | ELISpot IL-10 Stimulation par Betv1 | ↑Tr1 à M6 puis ↓ | ELISpot IL-5 Et IFNγ : Stimulation par Betv-1 après 8j de culture | Cellules T sécrétant l'IL-5 : ↑M6 et ↓M18 et M30 Cellules T sécrétant IFN-γ : ↓ puis retour au niveau de base après le traitement | PBMC stimulés par Betv-1 CK dosées en ELISA ds les SN de cultures à J3 (IL-10) ou J7 (IL-5 et IFNγ) | ↑IL-5 et IL-10 à M6 puis ↓ Pas de ↑de l'IFNγ | Diminution des TH2 spécifiques persistant après arrêt de la SIT Augmentation transitoire des Tr1 spécifiques Diminution puis retour à la normale des TH1 |
| E. Wambre et al. JACI 2012 (126) | Pollen d'aulne SLIT | | | Tétramères de classe II/Aln g 1 +Marquage intra-cellulaire | >3ans de SIT ↑CD4 ⁺ CD27 ⁺ /CD4 ⁺ CD27 ⁻ (↑Th1-Tr1/Th2) =Déplétion CD4 ⁺ CD27 ⁻ | | | CD4 ⁺ CD27 ⁺ sont IFNγ ⁺ CD4 ⁺ CD27 ⁻ sont IL-4 ⁺ |
| A-S Høiby et al. Clin Exp Allergy 2010 (154) | Pollen de bouleau SCIT | ELISpot 42h IL-10 et IL-12 Stimulation par Bet v1 | Pas de modifications | ELISpot 42h IL-4 et IL-13 Bet v1 | M18 : disparition de l'↑ du nb cellules produisant IL-4 et IL-13 pendant la saison | | | |
| K.Yamanaka et al JACI 2009 (149) | Pollen de cèdre japonais SLIT | Marquage anti-IL-10 intra cellulaire après stimulation par Cry j 1 et Cry j 2 | ↑ CD4 ⁺ IL-10 ⁺ (Tr1) spécifiques et non spécifiques | Etude de la prolifération en CFSE sur 4 j de stimulation avec Cry j 1 et Cry j 2 | ↓prolifération cellules T spécifiques abolie par anti-IL-10 | | | Augmentation des Tr1 sécréteurs d'IL-10 avec une grande diversité de répertoire du TCR |
| S. Radulovic et al. JACI 2008 (144) | Pollen de graminées SCIT | IF <i>in situ</i> | M24 : ↑CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ dans la muqueuse nasale CD3 ⁺ Foxp3 ⁺ IL-10 ⁺ en saison | | | | | Analyse <i>in situ</i> |
| B. Bohle et al. JACI 2007 (286) | Pollen de bouleau SLIT | -PBMC en culture 6h + extrait de bouleau. Extraction ARN IL-10, Foxp3, TGF-β | -4semaines : ↑CD4 ⁺ CD25 ⁺ ↑Foxp3 et IL-10 -M12 ↓ IL-10 et Foxp3 | PBMC en culture 6j + extrait de bouleau puis incorporation de Thymidine H ³ | 4 semaines: ↓prolifération cellules T spécifiques abolie par anti-IL-10 ou ajout de CD4+CD25+ -M12 ↓ IL-4 et ↑ IFNγ (Extraction ARN) | PBMC en culture 6h + extrait de bouleau. ELISA sur les SN (IL-10, TGF-β) | -4 semaines : ↑ IL-10 TGF-β inchangé | Augmentation des cellules suppressives transitoire. Rôle de l'IL-10. ↑ IFNγ |

| | | | | | | | | |
|--|-----------------------------|--|--|-----------------------------------|---|---|---|---|
| KT, Nouri-Aria J.Immunology 2004 (174) | Pollen de graminées SCIT | Muqueuse nasale : ARNm | -24M : ↑CD3+IL-10+ in situ | | | PBMC en culture 6 jours ELISA sur les SN | ↑IL-10 SN en saison | Analyse <i>in situ</i> |
| JN. Francis JACI 2003 (175) | Pollens de graminées | M18 : PBMC en culture 6 jours + P pratense -Marquage intracellulaire | -↑CD4 ⁺ CD25 ⁺ IL-10 | | | M18 : PBMC en culture 6 jours ELISA/SN | M18 : SN : ↑IL-10, IL-4, IL-5. TGF-β inchangé | Augmentation des cellules suppressives et de l'IL-10 |
| ITA aux ACARIENS | | | | | | | | |
| RE O'Hehir AJRCCM 2009 (152) | Acariens SLIT | -prolifération en CFSE pdt 7 jours. %Treg Foxp3+évalué -Cocultures avec marquage ³ H thymidine CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{lo} et CD4 ⁺ CD25 ⁻ CD127 ^{lo} %suppression et cytokinesdosées dans les surnageants (CBA) | -↑CD4+Foxp3+ non proliférantes à 12m puis ↓ à 24m -à 24 mois les Treg suppriment plus les Teff, réversible avec anti- TGF-β | | | Cultures 5 jours avec extrait d'acariens CKdosées dans le SN (CBA) | ↓ de l'IL-5, IL-6 à 6, 12 et 24 mois. ↓ IFN γ à 12 mois et ↑24 mois ↓ IL-10 à 12 mois et ↑24 mois ↓TGF-β 24m | Effet suppresseur des Treg dépendant du TGF-β ↑ IFNγ |
| L Cosmi Clin Exp Allergy 2006 (173) | Acariens SLIT | -Cultures de cellules en présence de l'allergène Der p 1 5 jours -Marquages intra cellulaires après 7 jours de cultures | -↑cellules sécrétant IL-10 à 24mois | | | -Cultures de cellules en présence de l'allergène (Derp1)5 jours -Marquages intra cellulaires après 7 jours de cultures | ↑ IFN- γ et IL-10 à 6 mois et 24 mois IL-4 inchangé -↑cellules sécrétant IFNγ à 24mois | ↑ IFNγ Augmentation des cellules suppressives et rôle de l'IL-10 |
| LM Gardner Clin Exp Allergy 2004 (148) | Acariens SCIT | Cultures de 14 jours avec un extrait d'acariens puis marquage intracellulaire | -↑ proportion et du Nb de CD4+CD25 ^{hi} IL-10+ à 9 mois | | | Cultures de 14 jours avec un extrait d'acariens puis marquage intracellulaire | -↓ proportion de CD4+IL-4+ et CD4+IFNγ+ à 9 mois | Augmentation des cellules suppressives |
| M Jutel EJI 2003 (94) | Acariens SCIT | Cultures de 10 j en présence de Der p 1 | -↑ proportion de CD4+CD25 ^{hi} IL-10+ à 2 mois Suppression de la prolifération spécifique d'antigène par les CD4+CD25 ⁺ réversible avec un anti-IL-10 ou anti-TGF-β | | | Cultures de 10 j en présence de Der p 1 Dosage des Ck ds le surnageant | ↓IL-5 IL-13 et IFNγ à 2 mois | Augmentation des cellules suppressives et rôle de l'IL-10 et TGF- β |
| ITA aux VENINS | | | | | | | | |
| A. Aslam et al. 2010 PLoS ONE (155) | venin de guêpe SCIT | ELISpot IL-10 Ves v 5 Tétramères de classe II | M2 :↑CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ IL-10 ⁺ Ves v 5 ⁺ | ELISpot IL-4 et IFN- γ Ves v 5 | M3 ↑ rapport du nb cellules produisant IL-10/IL-4 Pas de ↓ nb cellules produisant IL-4 | | | Même précurseur CD4 ⁺ IL-4 ⁺ et CD4 ⁺ IL-10 ⁺ |

SN : surnageants IF : immunofluorescence CBA : Cytokine Beads Assay CK : cytokines
SCIT: ITA sous-cutanée SLIT: ITA sub-linguale

L'immunothérapie spécifique d'antigène dans les maladies allergiques et auto-immunes.

Actuellement, l'induction de tolérance par l'antigène retient l'attention de beaucoup de chercheurs et de cliniciens dans différentes disciplines (287). L'approche empirique remonte au début du XXème siècle (Noon, 1911) avec la première description d'une ITA efficace. La désensibilisation aux pneumallergènes reste la plus utilisée et la plus étudiée. Depuis quelques années, l'induction de tolérance dans l'allergie alimentaire a pris une place importante en clinique et certains protocoles de désensibilisations aux aliments (comme le lait, l'œuf ou l'arachide) sont en cours. L'ITA a pour but d'induire une tolérance à l'allergène là où il y a eu une rupture ou un retard à l'établissement de cette tolérance, pour une raison encore mal expliquée.

Cette rupture de tolérance est également à l'origine du développement des maladies auto-immunes. De la même façon, le traitement est symptomatique ou repose sur l'immunosuppression non spécifique. Le traitement du diabète de type 1 (DID) repose sur l'administration d'insuline pour éviter l'hyperglycémie. Les produits biologiques bloquant le TNF α sont utilisés dans nombre de maladies dont la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires de l'intestin.

Les maladies auto-immunes sont souvent sévères et invalidantes et leur incidence est en augmentation, comme pour les maladies allergiques. Cependant le développement d'immunothérapies spécifiques d'auto-antigène est plus récent que dans le domaine de l'allergie. Les résultats sont aussi beaucoup plus décevants, chez l'homme en tout cas comme nous le décrivons dans le tableau II. Plusieurs raisons peuvent expliquer le « retard » au développement de l'immunothérapie spécifique d'auto-antigène par rapport à l'ITA. Les maladies auto-immunes sont nombreuses. Elles sont également hétérogènes. Certaines sont systémiques et d'autres sont spécifiques d'organe. L'auto-antigène vis-à-vis duquel la

tolérance a été rompue n'est pas toujours connu et décrit. Dans certaines maladies il y a un phénomène d'« epitope spreading », c'est-à-dire qu'au cours de la pathogénèse et de l'évolution de la maladie les auto-antigènes et les épitopes vis-à-vis desquels se met en place la réaction immunitaire se multiplient et se diversifient (288). Il n'est donc pas aisé de cibler l'auto-antigène utilisable pour essayer d'induire une tolérance. Par ailleurs, la réaction immunitaire qui se développe au cours des maladies auto-immunes est souvent à l'origine de détérioration voire même de destruction d'organes. La maladie devient symptomatique une fois que certaines lésions irréversibles existent déjà. Le diagnostic est porté tardivement par rapport au début du processus auto-immun. Aussi, lorsque le traitement par immunothérapie spécifique peut être débuté, les lésions sont souvent trop avancées pour que le traitement puisse avoir un effet curatif.

De ce fait, l'idéal serait théoriquement de traiter une maladie auto-immune le plus précocement possible. Dans ce cas, l'organe ou les organes cibles seraient encore fonctionnels si ce n'est intacts. Le but serait d'induire un effet « bystander » c'est-à-dire une immunorégulation ou une immunosuppression vis-à-vis d'un auto-antigène, qui s'étendrait secondairement à plusieurs auto-antigènes.

Deux maladies ont plus particulièrement été à l'origine de protocoles d'induction de tolérance par l'antigène chez l'homme: la sclérose en plaques (SEP) et le DID (tableau B) (81,289–292). Jusqu'à présent aucune démarche n'a permis d'obtenir la guérison ou un ralentissement de la progression de la pathologie notable. Il n'y a actuellement aucun traitement par auto-antigène utilisé en routine comme la désensibilisation l'est en allergologie.

Dans le diabète auto-immun, le diagnostic est posé lors de l'apparition des premiers symptômes d'hyperglycémie (syndrome polyuropolydipsique). A ce moment-là, plus de 90% du pancréas exocrine est détruit. Il a été proposé de débiter le traitement avant d'avoir atteint

ce stade. Dans ce cas, une population de patients « à risque » de développer un diabète a été traitée par insuline. Ces patients étaient définis à risque par leur terrain génétique (CMH) et la présence de certains auto-anticorps dirigés contre la cellule beta du pancréas en l'absence d'hyperglycémie. Ils étaient traités par insuline par voie orale, intranasale ou sous-cutanée en fonction des études. Aucune diminution de l'incidence du diabète de type 1 chez les personnes traitées n'a été observée (293–295).

La dose et la voie d'administration de l'allergène sont aussi des éléments déterminants dans l'induction de tolérance. L'administration de faibles doses d'antigène induit une anergie. L'utilisation de fortes doses d'antigène permet le développement de cellules Tr1 spécifiques d'antigène à l'origine d'une immunorégulation efficace (296,297). En allergologie les voies sous-cutanées et sublinguales sont les plus efficaces. Administrer de l'insuline à haute dose par voie sous-cutanée n'est pas envisageable du fait du risque d'hypoglycémie.

Plus récemment, l'administration de l'auto-antigène a été tentée par l'intermédiaire de plasmides contenant l'ADN et pouvant également induire la co-expression de cytokines immunomodulatrices. Cette approche ainsi que l'introduction de microRNA sont en cours d'étude.

Enfin, l'immunopathogénèse des maladies auto-immunes est différente de celle des allergies. Dans le cas de l'auto-immunité, la cellule effectrice est le lymphocyte T auxiliaire ou helper de type 1 alors que dans l'allergie, c'est le lymphocyte T helper de type 2. Cependant, dans ces 2 cas comme dans les infections, l'induction d'une population de cellules régulatrice sécrétrices d'IL-10 est associée à la régulation efficace de la réponse inflammatoire (43,64,298,299).

Tableau B. Immunothérapie par l'antigène dans les maladies auto-immunes

| Références | Etude | Pathologie | Antigène | Voie d'administration | Type d'étude | Nombre de patients | Résultat |
|---|-----------|---------------------------------------|---|-----------------------|--------------|--------------------|---|
| Gonsette 1977 J Neurol (300) | | SEP | Protéine basique de la myéline | SC | | 35 patients | Echec |
| Comi 2009 Lancet (301) | PreCISe * | SEP débutante | Copaxone® Glatiramer acetate Copolymère de 4 AA de la MBP | SC | Phase I/II | 481 patients | Diminution du taux (et augmentation du délais) de passage à une forme progressive |
| Warren 2006 Eur J Neurol (302) | | SEP progressive | MBP 8298 | IV | | 32 | Retard dans la progression de la maladie |
| Freedman 2011 Neurology (303) | | SEP secondairement progressive | MBP 8298 | IV | Phase III | 612 patients | Echec |
| Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group. 2002 NEJM (293) | DPT1 | Sujets à risque de développer un DID | Insuline lente | SC | | 339 | Echec |
| Skylar 2005 Diabetes Care (295) | DPT1 | Sujets à risque de développer un DID | Insuline | PO | | 372 | Echec |
| Näntö-Salonen K 2008 Lancet (294) | DIPP | Enfants à risque de développer un DID | Insuline | IN | | 264 enfants | Echec |
| J Ludvigsson 2012 NEJM (304) | DIAMYD | DID de découverte récente | GAD65-Alum | SC | Phase II | 334 patients | Echec |
| Thrower 2009 Clin Exp Immunol (305) | | DID ancien | Pro-insuline Peptide C19-A3 | Intra dermique | Phase I | 36 | Pas d'évaluation clinique |
| Orban 2010 Autoimmunity (306) | | DID de découverte récente | Chaîne β de l'insuline | IM | Phase I | 12 | Pas d'évaluation clinique |
| Alleva 2006 Scand J Immunol (307) | | DID de découverte récente | NBI-6024 Peptide la chaîne β de l'insuline | SC | Phase | 32 | Pas d'évaluation clinique |
| Raz I 2001 Lancet (308) | | DID de découverte récente | DiaPep277 dérivé de HSP60 | SC | | 35 | Préservation de la sécrétion endogène d'insuline pendant 18mois |

*Il a initialement été envisagé que le Copaxone® agissait comme antigène, analogue de la MBP dans la SEP.
SEP : sclérose en plaques, DID : diabète de type 1, SC : sous-cutané, po : per-os, IN : intranasal, IM : intra-musculaire,

Conclusion : la recherche translationnelle, intérêts et difficultés.

L'ensemble de ces trois études a permis de montrer que l'étude de la réponse lymphocytaire T spécifique d'allergène est un outil précieux dans le diagnostic de l'allergie alimentaire et respiratoire de l'enfant ainsi que dans la compréhension des mécanismes d'induction de tolérance à l'allergène dans l'ITA. La force de ce travail a été de pouvoir étudier des patients ayant un diagnostic très précis et exhaustif sur le plan clinique. Par ailleurs, l'étude d'enfants est très informative du fait qu'ils présentent rarement des polypathologies comme les adultes et leur symptomatologie est souvent « pure » et plus facilement ramenée à une étiologie unique. De ce fait, l'interprétation des résultats immunologiques obtenus a pu être d'autant plus pertinente et il nous semblerait intéressant de pouvoir étudier les caractéristiques des cellules Th2 spécifiques d'allergène en clinique courante.

Cependant, plusieurs éléments rendent la recherche translationnelle compliquée. La diversité des personnes humaines contrairement aux souris de souche génétiquement pure implique souvent une grande dispersion au niveau des résultats, et trouver des différences significatives nécessite de nombreux patients. Les prélèvements sont plus restreints au niveau du compartiment analysé (essentiellement le sang périphérique) que chez l'animal et il est difficile de mener des études mécanistiques. Enfin, le suivi longitudinal dure souvent plusieurs mois (contre quelques semaines chez la souris) et il est par conséquent plus laborieux d'obtenir des résultats.

Néanmoins le lien entre la science et la clinique nous semble essentiel pour permettre l'évolution de la qualité de la prise en charge des patients.

RÉFÉRENCES

1. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med*. 23 nov 2006;355(21):2226-2235.
2. Anandan C, Nurmatov U, van Schayck OCP, Sheikh A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy*. févr 2010;65(2):152-167.
3. Aït-Khaled N, Pearce N, Anderson HR, Ellwood P, Montefort S, Shah J. Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three. *Allergy*. janv 2009;64(1):123-148.
4. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 25 avr 1998;351(9111):1225-1232.
5. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 3 avr 2008;358(14):1483-1494.
6. Williams H, Flohr C. How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. juill 2006;118(1):209-213.
7. Braman SS. The global burden of asthma. *Chest*. juill 2006;130(1 Suppl):4S-12S.
8. Sennhauser FH, Braun-Fahrlander C, Wildhaber JH. The burden of asthma in children: a European perspective. *Paediatr Respir Rev*. mars 2005;6(1):2-7.
9. Van den Akker-van Marle ME, Bruil J, Detmar SB. Evaluation of cost of disease: assessing the burden to society of asthma in children in the European Union. *Allergy*. févr 2005;60(2):140-149.
10. O'Connell EJ. The burden of atopy and asthma in children. *Allergy*. août 2004;59 Suppl 78:7-11.
11. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. mai 2004;59(5):469-478.
12. Dabelea D. The accelerating epidemic of childhood diabetes. *Lancet*. 13 juin 2009;373(9680):1999-2000.
13. Kondrashova A, Seiskari T, Ilonen J, Knip M, Hyöty H. The 'Hygiene hypothesis' and the sharp gradient in the incidence of autoimmune and allergic diseases between Russian Karelia and Finland. *APMIS*. 2012;n/a-n/a.
14. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach J-F. The « hygiene hypothesis » for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*. avr 2010;160(1):1-9.

15. Zacccone P, Fehervari Z, Phillips JM, Dunne DW, Cooke A. Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunol.* oct 2006;28(10):515-523.
16. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 18 nov 1989;299(6710):1259-1260.
17. Bach J-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 19 sept 2002;347(12):911-920.
18. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* déc 2003;112(6 Suppl):S118-127.
19. Barnetson RSC, Rogers M. Childhood atopic eczema. *BMJ.* 8 juin 2002;324(7350):1376-1379.
20. Herr M, Clarisse B, Nikasinovic L, Foucault C, Le Marec A-M, Giordanella J-P, et al. Does allergic rhinitis exist in infancy? Findings from the PARIS birth cohort. *Allergy.* févr 2011;66(2):214-221.
21. Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* avr 2011;3(2):67-73.
22. Van der Hulst AE, Klip H, Brand PLP. Risk of developing asthma in young children with atopic eczema: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2007;120(3):565-569.
23. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WHI, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2009;124(3 Suppl 2):R2-6.
24. Soyer OU, Akdis M, Ring J, Behrendt H, Cramer R, Lauener R, et al. Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy.* 2013;68(2):161-70.
25. Akdis M, Akdis CA. IgE class switching and cellular memory. *Nat Immunol.* avr 2012;13(4):312-314.
26. Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev.* août 2005;206:232-259.
27. Owen RD. IMMUNOGENETIC CONSEQUENCES OF VASCULAR ANASTOMOSES BETWEEN BOVINE TWINS. *Science.* 19 oct 1945;102(2651):400-401.
28. BILLINGHAM RE, BRENT L, MEDAWAR PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature.* 3 oct 1953;172(4379):603-606.
29. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol.* oct 2005;5(10):772-782.
30. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:139-176.

31. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol.* déc 2009;9(12):833-844.
32. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* mars 2003;3(3):253-257.
33. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-J, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 15 déc 2003;198(12):1875-1886.
34. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity.* 22 mai 2009;30(5):626-635.
35. Bach JF, Chatenoud L. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:131-161.
36. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 août 1995;155(3):1151-1164.
37. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol.* avr 2001;2(4):301-306.
38. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* avr 2003;4(4):330-336.
39. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science.* 14 févr 2003;299(5609):1057-1061.
40. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* janv 2001;27(1):20-21.
41. Paiva RS, Lino AC, Bergman M-L, Caramalho I, Sousa AE, Zelenay S, et al. Recent thymic emigrants are the preferential precursors of regulatory T cells differentiated in the periphery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 avr 2013;110(16):6494-6499.
42. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, et al. Immune Responses in Healthy and Allergic Individuals Are Characterized by a Fine Balance between Allergen-specific T Regulatory 1 and T Helper 2 Cells. *J Exp Med.* 7 juin 2004;199(11):1567-1575.
43. Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Rückert B, Akdis CA, Akdis M. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med.* 24 nov 2008;205(12):2887-2898.

44. Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, et al. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 1 févr 1994;179(2):493-502.
45. Pot C, Apetoh L, Kuchroo VK. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Semin Immunol*. juin 2011;23(3):202-208.
46. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*. août 2006;212:28-50.
47. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med*. 28 avr 2013;
48. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*. 4 juin 2001;193(11):1285-1294.
49. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 4 juin 2001;193(11):1303-1310.
50. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. mars 2007;13(3):108-116.
51. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. juill 2010;10(7):490-500.
52. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2001;167(3):1245-1253.
53. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 10 juill 2006;203(7):1701-1711.
54. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 19 juin 2009;30(6):899-911.
55. Battaglia M, Roncarolo MG. The Tregs' world according to GARP. *Eur J Immunol*. déc 2009;39(12):3296-3300.
56. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 août 2009;106(32):13439-13444.

57. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK. Helios+ and Helios- Cells Coexist within the Natural FOXP3+ T Regulatory Cell Subset in Humans. *J Immunol.* 3 janv 2013;190(5):2001-2008.
58. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 avr 2010;184(7):3433-3441.
59. Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood.* 29 oct 2009;114(18):3727-3735.
60. Swamy RS, Reshamwala N, Hunter T, Vissamsetti S, Santos CB, Baroody FM, et al. Epigenetic modifications and improved regulatory T-cell function in subjects undergoing dual sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2012;130(1):215-224.e7.
61. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* juill 2008;8(7):523-532.
62. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol.* déc 2010;10(12):838-848.
63. Ostroukhova M, Seguin-Devaux C, Oriss TB, Dixon-McCarthy B, Yang L, Ameredes BT, et al. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J Clin Invest.* juill 2004;114(1):28-38.
64. Campbell JD, Buckland KF, McMillan SJ, Kearley J, Oldfield WLG, Stern LJ, et al. Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10-dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression. *J Exp Med.* 6 juill 2009;206(7):1535-1547.
65. Platts-Mills TAE, Woodfolk JA. Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunol Rev.* juill 2011;242(1):51-68.
66. Fear VS, Burchell JT, Lai SP, Wikstrom ME, Blank F, von Garnier C, et al. Restricted aeroallergen access to airway mucosal dendritic cells in vivo limits allergen-specific CD4+ T cell proliferation during the induction of inhalation tolerance. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 nov 2011;187(9):4561-4570.
67. Novak N, Allam J-P. Mucosal dendritic cells in allergy and immunotherapy. *Allergy.* juill 2011;66 Suppl 95:22-24.
68. Bellinghausen I, Reuter S, Martin H, Maxeiner J, Luxemburger U, Türeci Ö, et al. Enhanced production of CCL18 by tolerogenic dendritic cells is associated with inhibition of allergic airway reactivity. *J Allergy Clin Immunol.* déc 2012;130(6):1384-1393.

69. Azzaoui I, Yahia SA, Chang Y, Vorng H, Morales O, Fan Y, et al. CCL18 differentiates dendritic cells in tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects. *Blood*. 29 sept 2011;118(13):3549-3558.
70. Hu J, Wan Y. Tolerogenic dendritic cells and their potential applications. *Immunology*. mars 2011;132(3):307-314.
71. Lu M, Dawicki W, Zhang X, Huang H, Nayyar A, Gordon JR. Therapeutic induction of tolerance by IL-10-differentiated dendritic cells in a mouse model of house dust mite-asthma. *Allergy*. mai 2011;66(5):612-620.
72. Besnard A-G, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*. juin 2011;41(6):1675-1686.
73. Patterson CC, Gyürüs E, Rosenbauer J, Cinek O, Neu A, Schober E, et al. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia*. août 2012;55(8):2142-2147.
74. Du Toit G, Katz Y, Sasieni P, Mesher D, Maleki SJ, Fisher HR, et al. Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. nov 2008;122(5):984-991.
75. Verhasselt V. Neonatal tolerance under breastfeeding influence. *Curr Opin Immunol*. oct 2010;22(5):623-630.
76. Verhasselt V. Oral tolerance in neonates: from basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal Immunol*. juill 2010;3(4):326-333.
77. Prescott SL. Allergic disease: understanding how in utero events set the scene. *Proc Nutr Soc*. 2010;69(03):366-372.
78. Dutta P, Burlingham WJ. Tolerance to noninherited maternal antigens in mice and humans. *Curr Opin Organ Transplant*. août 2009;14(4):439-447.
79. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*. 5 déc 2008;322(5907):1562-1565.
80. Polte T, Hansen G. Maternal tolerance achieved during pregnancy is transferred to the offspring via breast milk and persistently protects the offspring from allergic asthma. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. déc 2008;38(12):1950-1958.
81. Verhasselt V, Milcent V, Cazareth J, Kanda A, Fleury S, Dombrowicz D, et al. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nat Med*. févr 2008;14(2):170-175.
82. Cardwell CR, Stene LC, Ludvigsson J, Rosenbauer J, Cinek O, Svensson J, et al. Breast-feeding and childhood-onset type 1 diabetes: a pooled analysis of individual

- participant data from 43 observational studies. *Diabetes Care*. nov 2012;35(11):2215-2225.
83. Kramer MS. Breastfeeding and allergy: the evidence. *Ann Nutr Metab*. 2011;59 Suppl 1:20-26.
 84. Oddy WH, Halonen M, Martinez FD, Lohman IC, Stern DA, Kurzius-Spencer M, et al. TGF-beta in human milk is associated with wheeze in infancy. *J Allergy Clin Immunol*. oct 2003;112(4):723-728.
 85. Kalliomäki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol*. déc 1999;104(6):1251-1257.
 86. Prescott SL, Wickens K, Westcott L, Jung W, Currie H, Black PN, et al. Supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* or *Bifidobacterium lactis* probiotics in pregnancy increases cord blood interferon-gamma and breast milk transforming growth factor-beta and immunoglobulin A detection. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. oct 2008;38(10):1606-1614.
 87. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 23 oct 2008;455(7216):1109-1113.
 88. Lönnqvist A, Ostman S, Almqvist N, Hultkrantz S, Teleme E, Wold AE, et al. Neonatal exposure to staphylococcal superantigen improves induction of oral tolerance in a mouse model of airway allergy. *Eur J Immunol*. févr 2009;39(2):447-456.
 89. Azad MB, Kozyrskyj AL. Perinatal programming of asthma: the role of gut microbiota. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:932072.
 90. Palmer DJ, Prescott SL. Does early feeding promote development of oral tolerance? *Curr Allergy Asthma Rep*. août 2012;12(4):321-331.
 91. Pelucchi C, Chatenoud L, Turati F, Galeone C, Moja L, Bach J-F, et al. Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. *Epidemiol Camb Mass*. mai 2012;23(3):402-414.
 92. Prescott S, Nowak-Węgrzyn A. Strategies to prevent or reduce allergic disease. *Ann Nutr Metab*. 2011;59 Suppl 1:28-42.
 93. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 21 févr 2004;363(9409):608-615.
 94. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszczyk M, Blaser K, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. mai 2003;33(5):1205-1214.

95. Akdis M. Immune Responses in Healthy and Allergic Individuals Are Characterized by a Fine Balance between Allergen-specific T Regulatory 1 and T Helper 2 Cells. *J Exp Med*. 1 juin 2004;199(11):1567-1575.
96. Gri G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity*. 14 nov 2008;29(5):771-781.
97. Nguyen KD, Vanichsarn C, Nadeau KC. Impaired IL-10-dependent induction of tolerogenic dendritic cells by CD4+CD25hiCD127lo/- natural regulatory T cells in human allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 nov 2009;180(9):823-833.
98. Anderson AE, Mackerness KJ, Aizen M, Carr VA, Nguyen D, Du Pre F, et al. Seasonal changes in suppressive capacity of CD4+ CD25+ T cells from patients with hayfever are allergen-specific and may result in part from expansion of effector T cells among the CD25+ population. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. nov 2009;39(11):1693-1699.
99. Grindebacke H, Larsson P, Wing K, Rak S, Rudin A. Specific immunotherapy to birch allergen does not enhance suppression of Th2 cells by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells during pollen season. *J Clin Immunol*. nov 2009;29(6):752-760.
100. Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*. avr 2003;111(4):862-868.
101. Wang L-H, Lin Y-H, Yang J, Guo W. Insufficient increment of CD4+CD25+ regulatory T cells after stimulation in vitro with allergen in allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;148(3):199-210.
102. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, et al. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. mai 2007;119(5):1258-1266.
103. Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C, Schmid-Grendelmeier P, Hijnen D, Knol EF, et al. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol*. janv 2006;117(1):176-183.
104. Mittag D, Scholzen A, Varese N, Baxter L, Paukovics G, Harrison LC, et al. The effector T cell response to ryegrass pollen is counterregulated by simultaneous induction of regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 mai 2010;184(9):4708-4716.
105. Mantel P-Y, Kuipers H, Boyman O, Rhyner C, Ouaked N, Rückert B, et al. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol*. déc 2007;5(12):e329.
106. Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Rückert B, Akdis CA, Akdis M. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med*. 24 nov 2008;205(12):2887-2898.

107. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-173.
108. Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* sept 1996;80(3 Pt 1):225-235.
109. Lanzavecchia A, Santini P, Maggi E, Del Prete GF, Falagiani P, Romagnani S, et al. In vitro selective expansion of allergen specific T cells from atopic patients. *Clin Exp Immunol.* avr 1983;52(1):21-28.
110. Vaughan K, Greenbaum J, Kim Y, Vita R, Chung J, Peters B, et al. Towards defining molecular determinants recognized by adaptive immunity in allergic disease: an inventory of the available data. *J Allergy.* 2010;2010:628026.
111. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* nov 2005;6(11):1123-1132.
112. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* nov 2005;6(11):1133-1141.
113. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta « reprograms » the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* déc 2008;9(12):1341-1346.
114. Jutel M, Akdis CA. T-cell subset regulation in atopy. *Curr Allergy Asthma Rep.* avr 2011;11(2):139-145.
115. Petersen BC, Budelsky AL, Baptist AP, Schaller MA, Lukacs NW. Interleukin-25 induces type 2 cytokine production in a steroid-resistant interleukin-17RB⁺ myeloid population that exacerbates asthmatic pathology. *Nat Med.* mai 2012;18(5):751-758.
116. Mjösberg J, Spits H. Type 2 innate lymphoid cells-new members of the « type 2 franchise » that mediate allergic airway inflammation. *Eur J Immunol.* mai 2012;42(5):1093-1096.
117. Wilhelm C, Hirota K, Stieglitz B, Van Snick J, Tolaini M, Lahl K, et al. An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat Immunol.* nov 2011;12(11):1071-1077.
118. Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR2 and CD161. *Nat Immunol.* nov 2011;12(11):1055-1062.
119. Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, et al. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood.* 1 nov 1998;92(9):3338-3345.

120. Wambre E, James EA, Kwok WW. Characterization of CD4⁺ T cell subsets in allergy. *Curr Opin Immunol.* déc 2012;24(6):700-706.
121. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 23 sept 2010;363(13):1211-1221.
122. Wan YI, Strachan DP, Evans DM, Henderson J, McKeever T, Holloway JW, et al. A genome-wide association study to identify genetic determinants of atopy in subjects from the United Kingdom. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2011;127(1):223-231, 231.e1-3.
123. Ramasamy A, Curjuric I, Coin LJ, Kumar A, McArdle WL, Imboden M, et al. A genome-wide meta-analysis of genetic variants associated with allergic rhinitis and grass sensitization and their interaction with birth order. *J Allergy Clin Immunol.* nov 2011;128(5):996-1005.
124. Woodfolk JA. T-cell responses to allergens. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2007;119(2):280-294; quiz 295-296.
125. Chan SMH, Turcanu V, Stephens AC, Fox AT, Grieve AP, Lack G. Cutaneous lymphocyte antigen and $\alpha 4\beta 7$ T-lymphocyte responses are associated with peanut allergy and tolerance in children. *Allergy.* janv 2012;n/a-n/a.
126. Wambre E, DeLong JH, James EA, LaFond RE, Robinson D, Kwok WW. Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4⁺ T-cell outcomes during specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2012;129(2):544-551, 551.e1-7.
127. Upadhyaya B, Yin Y, Hill BJ, Douek DC, Prussin C. Hierarchical IL-5 expression defines a subpopulation of highly differentiated human Th2 cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 sept 2011;187(6):3111-3120.
128. Prussin C, Lee J, Foster B. Eosinophilic gastrointestinal disease and peanut allergy are alternatively associated with IL-5⁺ and IL-5⁻ T(H)2 responses. *J Allergy Clin Immunol.* déc 2009;124(6):1326-1332.e6.
129. DeLong JH, Simpson KH, Wambre E, James EA, Robinson D, Kwok WW. Arah 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* mai 2011;127(5):1211-1218.e3.
130. Parviainen S, Taivainen A, Liukko A, Nieminen A, Rytkönen-Nissinen M, Kinnunen T, et al. Comparison of the allergic and nonallergic CD4⁺ T-cell responses to the major dog allergen Can f 1. *J Allergy Clin Immunol.* août 2010;126(2):406-408, 408.e1-4.
131. Kinnunen T, Nieminen A, Kwok WW, Närvänen A, Rytkönen-Nissinen M, Saarelainen S, et al. Allergen-specific naïve and memory CD4⁺ T cells exhibit functional and phenotypic differences between individuals with or without allergy. *Eur J Immunol.* sept 2010;40(9):2460-2469.

132. Lin SY, Erekosima N, Kim JM, Ramanathan M, Suarez-Cuervo C, Chelladurai Y, et al. Sublingual immunotherapy for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis and asthma: a systematic review. *JAMA J Am Med Assoc.* 27 mars 2013;309(12):1278-1288.
133. Ozdemir C, Kucuksezer UC, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* sept 2011;41(9):1226-1234.
134. Möller C, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Høst A, Jacobsen L, et al. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J Allergy Clin Immunol.* févr 2002;109(2):251-256.
135. Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Høst A, et al. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy.* août 2007;62(8):943-948.
136. Purello-D'Ambrosio F, Gangemi S, Merendino RA, Isola S, Puccinelli P, Parmiani S, et al. Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* août 2001;31(8):1295-1302.
137. Pajno GB, Barberio G, De Luca F, Morabito L, Parmiani S. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* sept 2001;31(9):1392-1397.
138. Durham SR, Emminger W, Kapp A, Colombo G, de Monchy JGR, Rak S, et al. Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2010;125(1):131-138.e1-7.
139. Akdis CA. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat Med.* mai 2012;18(5):736-749.
140. Eberlein-König B, Ullmann S, Thomas P, Przybilla B. Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* août 1995;25(8):704-712.
141. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2011;127(1):18-27; quiz 28-29.
142. Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol.* juin 2008;8(6):478-486.
143. Campbell JD, Buchmann P, Kesting S, Cunningham CR, Coffman RL, Hessel EM. Allergen-specific T cell responses to immunotherapy monitored by CD154 and

- intracellular cytokine expression. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* juill 2010;40(7):1025-1035.
144. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4⁺ CD25⁺ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2008;121(6):1467-1472, 1472.e1.
 145. Pilette C, Nouri-Aria KT, Jacobson MR, Wilcock LK, Detry B, Walker SM, et al. Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 avr 2007;178(7):4658-4666.
 146. Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR, Lee DI, Wilson D, Lima MT, et al. Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* avr 2010;40(4):598-606.
 147. Wei S, Kryczek I, Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood.* 15 juill 2006;108(2):426-431.
 148. Gardner LM, Thien FC, Douglass JA, Rolland JM, O'Hehir RE. Induction of T « regulatory » cells by standardized house dust mite immunotherapy: an increase in CD4⁺ CD25⁺ interleukin-10⁺ T cells expressing peripheral tissue trafficking markers. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* août 2004;34(8):1209-1219.
 149. Yamanaka K, Yuta A, Kakeda M, Sasaki R, Kitagawa H, Gabazza EC, et al. Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis. *J Allergy Clin Immunol.* oct 2009;124(4):842-845.e7.
 150. Antúnez C, Mayorga C, Corzo JL, Jurado A, Torres MJ. Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol.* mai 2008;19(3):210-218.
 151. Möbs C, Slotosch C, Löffler H, Jakob T, Hertl M, Pfützner W. Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 févr 2010;184(4):2194-2203.
 152. O'Hehir RE, Gardner LM, de Leon MP, Hales BJ, Biondo M, Douglass JA, et al. House dust mite sublingual immunotherapy: the role for transforming growth factor-beta and functional regulatory T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 nov 2009;180(10):936-947.
 153. Möbs C, Ipsen H, Mayer L, Slotosch C, Petersen A, Würtzen PA, et al. Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol.* nov 2012;130(5):1108-1116.e6.

154. Höiby A-S, Strand V, Robinson DS, Sager A, Rak S. Efficacy, safety, and immunological effects of a 2-year immunotherapy with Depigoid birch pollen extract: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. juill 2010;40(7):1062-1070.
155. Aslam A, Chan H, Warrell DA, Misbah S, Ogg GS. Tracking antigen-specific T-cells during clinical tolerance induction in humans. *PLoS ONE*. 2010;5(6):e11028.
156. Tsai Y-G, Chien J-W, Chen W-L, Shieh J-J, Lin C-Y. Induced apoptosis of TH2 lymphocytes in asthmatic children treated with *Dermatophagoides pteronyssinus* immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol*. nov 2005;16(7):602-608.
157. Guerra F, Carracedo J, Solana-Lara R, Sánchez-Guijo P, Ramírez R. TH2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J Allergy Clin Immunol*. avr 2001;107(4):647-653.
158. Wei J, Duramad O, Perng OA, Reiner SL, Liu Y-J, Qin FX-F. Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13 nov 2007;104(46):18169-18174.
159. Hadjur S, Bruno L, Hertweck A, Cobb BS, Taylor B, Fisher AG, et al. IL4 blockade of inducible regulatory T cell differentiation: the role of Th2 cells, Gata3 and PU.1. *Immunol Lett*. 29 janv 2009;122(1):37-43.
160. Pillemer BBL, Qi Z, Melgert B, Oriss TB, Ray P, Ray A. STAT6 activation confers upon T helper cells resistance to suppression by regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 juill 2009;183(1):155-163.
161. Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. avr 2009;39(4):469-477.
162. James LK, Shamji MH, Walker SM, Wilson DR, Wachholz PA, Francis JN, et al. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol*. févr 2011;127(2):509-516.e1-5.
163. Novak N, Bieber T, Allam J-P. Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. juin 2011;66(6):733-739.
164. Moingeon P, Mascarell L. Induction of tolerance via the sublingual route: mechanisms and applications. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:623474.
165. Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 déc 2004;173(11):6526-6531.

166. Calderón MA, Casale TB, Togias A, Bousquet J, Durham SR, Demoly P. Allergen-specific immunotherapy for respiratory allergies: from meta-analysis to registration and beyond. *J Allergy Clin Immunol*. janv 2011;127(1):30-38.
167. Durham SR, Leung DYM. One hundred years of allergen immunotherapy: time to ring the changes. *J Allergy Clin Immunol*. janv 2011;127(1):3-7.
168. Senna G, Calderon M, Makatsori M, Ridolo E, Passalacqua G. An evidence-based appraisal of the surrogate markers of efficacy of allergen immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. août 2011;11(4):375-380.
169. James LK, Bowen H, Calvert RA, Dodev TS, Shamji MH, Beavil AJ, et al. Allergen specificity of IgG(4)-expressing B cells in patients with grass pollen allergy undergoing immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. sept 2012;130(3):663-670.e3.
170. James LK, Shamji MH, Walker SM, Wilson DR, Wachholz PA, Francis JN, et al. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol*. févr 2011;127(2):509-516.e1-5.
171. Van Overtvelt L, Wambre E, Maillère B, von Hofe E, Louise A, Balazuc AM, et al. Assessment of Bet v 1-specific CD4+ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 avr 2008;180(7):4514-4522.
172. Piconi S, Trabattoni D, Rainone V, Borgonovo L, Passerini S, Rizzardini G, et al. Immunological effects of sublingual immunotherapy: clinical efficacy is associated with modulation of programmed cell death ligand 1, IL-10, and IgG4. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 déc 2010;185(12):7723-7730.
173. Cosmi L, Santarlasci V, Angeli R, Liotta F, Maggi L, Frosali F, et al. Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon-gamma- and interleukin-10-production. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. mars 2006;36(3):261-272.
174. Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, Wilcock LK, et al. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 mars 2004;172(5):3252-3259.
175. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. juin 2003;111(6):1255-1261.
176. Ajduk J, Marinic I, Aberle N, Rabatic S, Gagro A. Effect of house dust mite immunotherapy on transforming growth factor beta1-producing T cells in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. avr 2008;100(4):314-322.

177. Ciprandi G, De Amici M, Tosca M, Marseglia G. Serum transforming growth factor-beta levels depend on allergen exposure in allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;152(1):66-70.
178. Klimek L, Wolf H, Mewes T, Dormann D, Reske-Kunz A, Schnitker J, et al. The effect of short-term immunotherapy with molecular standardized grass and rye allergens on eosinophil cationic protein and tryptase in nasal secretions. *J Allergy Clin Immunol.* janv 1999;103(1 Pt 1):47-53.
179. Pronk-Admiraal CJ, Schilte PP, Bartels PC. Effect of immunotherapy on eosinophil activation in pollen sensitive children. *Clin Lab.* 2001;47(5-6):231-238.
180. Kim S-T, Han DH, Moon IJ, Lee CH, Min Y-G, Rhee C-S. Clinical and immunologic effects of sublingual immunotherapy on patients with allergic rhinitis to house-dust mites: 1-year follow-up results. *Am J Rhinol Allergy.* août 2010;24(4):271-275.
181. Kopp MV, Mayatepek E, Engels E, Brauburger J, Riedinger F, Ihorst G, et al. Urinary leukotriene E4 levels in children with allergic rhinitis treated with specific immunotherapy and anti-IgE (Omalizumab). *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol.* oct 2003;14(5):401-404.
182. Dinakar C, Van Osdol TJ, Barnes CS, Dowling PJ, Zeigler AW. Changes in exhaled nitric oxide levels with immunotherapy. *Allergy Asthma Proc Off J Reg State Allergy Soc.* avr 2006;27(2):140-144.
183. Passalacqua G, Senna G, Dama A, Riccio A, Crivellaro M, Canonica GW. The relationship between clinical efficacy of specific immunotherapy and serum intercellular adhesion molecule-1 levels. *J Investig Allergol Clin Immunol Off Organ Int Assoc Asthmology INTERASMA Soc Latinoam Alerg E Inmunol.* avr 1998;8(2):123-124.
184. Passalacqua G, Albano M, Fregonese L, Riccio A, Pronzato C, Mela GS, et al. Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet.* 28 févr 1998;351(9103):629-632.
185. Nelson RP Jr, DiNicolo R, Fernández-Caldas E, Seleznick MJ, Lockey RF, Good RA. Allergen-specific IgE levels and mite allergen exposure in children with acute asthma first seen in an emergency department and in nonasthmatic control subjects. *J Allergy Clin Immunol.* août 1996;98(2):258-263.
186. Zhang C, Li J, Lai X, Zheng Y, Gjesing B, Spangfort MD, et al. House dust mite and storage mite IgE reactivity in allergic patients from Guangzhou, China. *Asian Pac J Allergy Immunol Launched Allergy Immunol Soc Thail.* déc 2012;30(4):294-300.
187. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol.* sept 2011;32(9):402-411.
188. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol.* mars 2008;8(3):193-204.

189. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, et al. Association between exposure to farming, allergies and genetic variation in CARD4/NOD1. *Allergy*. sept 2006;61(9):1117-1124.
190. Willart M, Hammad H. Lung dendritic cell-epithelial cell crosstalk in Th2 responses to allergens. *Curr Opin Immunol*. déc 2011;23(6):772-777.
191. Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. oct 2012;130(4):845-852.
192. Branum AM, Lukacs SL. Food Allergy Among Children in the United States. *Pediatrics*. déc 2009;124(6):1549-1555.
193. Kuehn BM. Food allergies becoming more common. *JAMA J Am Med Assoc*. 26 nov 2008;300(20):2358.
194. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. sept 2007;120(3):638-646.
195. Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among U.S. children: trends in prevalence and hospitalizations. *NCHS Data Brief*. oct 2008;(10):1-8.
196. Ross MP, Ferguson M, Street D, Klontz K, Schroeder T, Luccioli S. Analysis of food-allergic and anaphylactic events in the National Electronic Injury Surveillance System. *J Allergy Clin Immunol*. janv 2008;121(1):166-171.
197. Decker WW, Campbell RL, Manivannan V, Luke A, St Sauver JL, Weaver A, et al. The etiology and incidence of anaphylaxis in Rochester, Minnesota: a report from the Rochester Epidemiology Project. *J Allergy Clin Immunol*. déc 2008;122(6):1161-1165.
198. Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, et al. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol*. mai 2008;121(5):1210-1218.e4.
199. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. mai 2004;113(5):805-819; quiz 820.
200. Fox AT, Sasieni P, du Toit G, Syed H, Lack G. Household peanut consumption as a risk factor for the development of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. févr 2009;123(2):417-423.
201. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. févr 2010;125(2 Suppl 2):S116-125.
202. Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. juin 2008;121(6):1331-1336.

203. Ross MP, Ferguson M, Street D, Klontz K, Schroeder T, Luccioli S. Analysis of food-allergic and anaphylactic events in the National Electronic Injury Surveillance System. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2008;121(1):166-171.
204. Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among U.S. children: trends in prevalence and hospitalizations. *NCHS Data Brief.* oct 2008;(10):1-8.
205. Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M, Thevenin F. Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2001;108(1):133-140.
206. Wassenberg J, Cochard M-M, Dunngalvin A, Ballabeni P, Flokstra-de Blok BMJ, Newman CJ, et al. Parent perceived quality of life is age-dependent in children with food allergy. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol.* août 2012;23(5):412-419.
207. Van der Velde JL, Flokstra-de Blok BMJ, Dunngalvin A, Hourihane JO, Duiverman EJ, Dubois AEJ. Parents report better health-related quality of life for their food-allergic children than children themselves. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* oct 2011;41(10):1431-1439.
208. Ostblom E, Egmar A-C, Gardulf A, Lilja G, Wickman M. The impact of food hypersensitivity reported in 9-year-old children by their parents on health-related quality of life. *Allergy.* févr 2008;63(2):211-218.
209. Wells, HG, Osborne, TB: The biological reactions of the vegetable proteins: anaphylaxis. *J Infect Dis* 1911 8 66-124.
210. Thottingal TB, Stefura BP, Simons FER, Bannon GA, Burks W, HayGlass KT. Human subjects without peanut allergy demonstrate T cell-dependent, TH2-biased, peanut-specific cytokine and chemokine responses independent of TH1 expression. *J Allergy Clin Immunol.* oct 2006;118(4):905-914.
211. Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest.* avr 2003;111(7):1065-1072.
212. Beyer K, Castro R, Birnbaum A, Benkov K, Pittman N, Sampson HA. Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2002;109(4):707-713.
213. Frischmeyer-Guerrero PA, Guerrero AL, Chichester KL, Bieneman AP, Hamilton RA, Wood RA, et al. Dendritic cell and T cell responses in children with food allergy. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* janv 2011;41(1):61-71.
214. Tiemessen MM, Van Ieperen-Van Dijk AG, Bruijnzeel-Koomen CA f m, Garssen J, Knol EF, Van Hoffen E. Cow's milk-specific T-cell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy: key role for IL-10. *J Allergy Clin Immunol.* mai 2004;113(5):932-939.

215. Scurlock AM, Vickery BP, Hourihane JO, Burks AW. Pediatric food allergy and mucosal tolerance. *Mucosal Immunol.* juill 2010;3(4):345-354.
216. Rescigno M. Dendritic cells in oral tolerance in the gut. *Cell Microbiol.* sept 2011;13(9):1312-1318.
217. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut.* mai 2010;59(5):595-604.
218. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med.* 21 juin 2004;199(12):1679-1688.
219. Shreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2009;123(1):43-52.e7.
220. Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* août 2009;124(2):292-300, 300.e1-97.
221. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2005;115(1):3-12; quiz 13.
222. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2009;124(1):3-20; quiz 21-22.
223. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science.* 8 juin 2012;336(6086):1268-1273.
224. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 août 1997;159(4):1739-1745.
225. Bashir MEH, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juin 2004;172(11):6978-6987.
226. Storrø O, Avershina E, Rudi K. Diversity of intestinal microbiota in infancy and the risk of allergic disease in childhood. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 3 avr 2013;
227. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BLK, Skov T, Paludan-Müller G, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2011;128(3):646-652.e1-5.

228. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2012;129(2):434-440, 440.e1-2.
229. Prescott SL, Björkstén B. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* août 2007;120(2):255-262.
230. Ozdemir O. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *Clin Exp Immunol.* juin 2010;160(3):295-304.
231. Berin MC, Sampson HA. Mucosal immunology of food allergy. *Curr Biol CB.* 6 mai 2013;23(9):R389-400.
232. Fernández-Rivas M, Bolhaar S, González-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, et al. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol.* août 2006;118(2):481-488.
233. Pascal M, Muñoz-Cano R, Reina Z, Palacín A, Vilella R, Picado C, et al. Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* oct 2012;42(10):1529-1539.
234. Järvinen KM, Celestin J. What's on the menu for prediction of natural history of cow's milk allergy beyond casein cocktails and epitope soup? *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* nov 2012;42(11):1549-1551.
235. Food allergy: a practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol.* mars 2006;96(3 Suppl 2):S1-68.
236. Elizur A, Rajuan N, Goldberg MR, Leshno M, Cohen A, Katz Y. Natural course and risk factors for persistence of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Pediatr.* sept 2012;161(3):482-487.e1.
237. Fiocchi A, Terracciano L, Bouygue GR, Veglia F, Sarratud T, Martelli A, et al. Incremental prognostic factors associated with cow's milk allergy outcomes in infant and child referrals: the Milan Cow's Milk Allergy Cohort study. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol.* août 2008;101(2):166-173.
238. Pucar F, Kagan R, Lim H, Clarke AE. Peanut challenge: a retrospective study of 140 patients. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* janv 2001;31(1):40-46.
239. Komata T, Söderström L, Borres MP, Tachimoto H, Ebisawa M. The predictive relationship of food-specific serum IgE concentrations to challenge outcomes for egg and milk varies by patient age. *J Allergy Clin Immunol.* mai 2007;119(5):1272-1274.
240. Roberts G, Lack G. Diagnosing peanut allergy with skin prick and specific IgE testing. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2005;115(6):1291-1296.

241. Celik-Bilgili S, Mehl A, Verstege A, Staden U, Nocon M, Beyer K, et al. The predictive value of specific immunoglobulin E levels in serum for the outcome of oral food challenges. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* mars 2005;35(3):268-273.
242. Perry TT, Matsui EC, Kay Conover-Walker M, Wood RA. The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2004;114(1):144-149.
243. Osterballe M, Bindslev-Jensen C. Threshold levels in food challenge and specific IgE in patients with egg allergy: is there a relationship? *J Allergy Clin Immunol.* juill 2003;112(1):196-201.
244. Boyano-Martínez T, García-Ara C, Díaz-Pena JM, Martín-Esteban M. Prediction of tolerance on the basis of quantification of egg white-specific IgE antibodies in children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol.* août 2002;110(2):304-309.
245. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* mai 2001;107(5):891-896.
246. García-Ara C, Boyano-Martínez T, Díaz-Pena JM, Martín-Muñoz F, Reche-Frutos M, Martín-Esteban M. Specific IgE levels in the diagnosis of immediate hypersensitivity to cows' milk protein in the infant. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2001;107(1):185-190.
247. Lin J, Bruni FM, Fu Z, Maloney J, Bardina L, Boner AL, et al. A bioinformatics approach to identify patients with symptomatic peanut allergy using peptide microarray immunoassay. *J Allergy Clin Immunol.* mai 2012;129(5):1321-1328.e5.
248. Cerecedo I, Zamora J, Shreffler WG, Lin J, Bardina L, Dieguez MC, et al. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2008;122(3):589-594.
249. Ford LS, Bloom KA, Nowak-Węgrzyn AH, Shreffler WG, Masilamani M, Sampson HA. Basophil reactivity, wheal size, and immunoglobulin levels distinguish degrees of cow's milk tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2013;131(1):180-186.e1-3.
250. Rubio A, Vivinus-Nébot M, Bourrier T, Saggio B, Albertini M, Bernard A. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy.* janv 2011;66(1):92-100.
251. Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, Goldman M, Casimir G, Mascart F, et al. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* août 2009;39(8):1234-1245.
252. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy.* avr 2008;63 Suppl 86:8-160.

253. GINA - the Global Initiative for Asthma [Internet]. [cité 11 juill 2012]. Disponible sur: <http://www.ginasthma.org/guidelines-gina-report-global-strategy-for-asthma.html>
254. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, et al. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2004;113(1):59-65.
255. Burks AW, Calderon MA, Casale T, Cox L, Demoly P, Jutel M, et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol.* 13 mars 2013;
256. Eifan AO, Akkoc T, Yildiz A, Keles S, Ozdemir C, Bahceciler NN, et al. Clinical efficacy and immunological mechanisms of sublingual and subcutaneous immunotherapy in asthmatic/rhinitis children sensitized to house dust mite: an open randomized controlled trial. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* juin 2010;40(6):922-932.
257. Bahceciler NN, Galip N. Comparing subcutaneous and sublingual immunotherapy: what do we know? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* déc 2012;12(6):640-647.
258. Bonvalet M, Moussu H, Wambre E, Ricarte C, Horiot S, Rimaniol A-C, et al. Allergen-specific CD4⁺ T cell responses in peripheral blood do not predict the early onset of clinical efficacy during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2012;42(12):1745-55.
259. Baron U, Türbachova I, Hellwag A, Eckhardt F, Berlin K, Hoffmuller U, et al. DNA methylation analysis as a tool for cell typing. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc.* mars 2006;1(1):55-60.
260. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol.* sept 2007;37(9):2378-2389.
261. Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T. IL-4 production by PBMCs on stimulation with mite allergen is correlated with the level of serum IgE antibody against mite in children with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2000;105(2, Part 1):327-332.
262. Nurse B, Puterman AS, Haus M, Berman D, Weinberg EG, Potter PC. PBMCs from both atopic asthmatic and nonatopic children show a TH2 cytokine response to house dust mite allergen. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2000;106(1 Pt 1):84-91.
263. Till S, Dickason R, Huston D, Humbert M, Robinson D, Larché M, et al. IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4⁺ T cells in primary culture: relationship to expression of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* avr 1997;99(4):563-569.
264. Till S, Durham S, Dickason R, Huston D, Bungre J, Walker S, et al. IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression. *Immunology.* mai 1997;91(1):53-57.

265. Chang JH, Chan H, Quirce S, Green T, Noertjojo K, Lam S, et al. In vitro T-lymphocyte response and house dust mite-induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol.* nov 1996;98(5 Pt 1):922-931.
266. Kwok WW, Roti M, Delong JH, Tan V, Wambre E, James EA, et al. Direct ex vivo analysis of allergen-specific CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2010;125(6):1407-1409.e1.
267. Tsuge I, Kondo Y, Tokuda R, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, et al. Allergen-specific helper T cell response in patients with cow's milk allergy: Simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution assay. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* déc 2006;36(12):1538-1545.
268. Motrich RD, Gottero C, Rezzonico C, Rezzonico C, Riera CM, Rivero V. Cow's milk stimulated lymphocyte proliferation and TNF α secretion in hypersensitivity to cow's milk protein. *Clin Immunol Orlando Fla.* nov 2003;109(2):203-211.
269. Bedoret D, Singh AK, Shaw V, Hoyte EG, Hamilton R, DeKruyff RH, et al. Changes in antigen-specific T-cell number and function during oral desensitization in cow's milk allergy enabled with omalizumab. *Mucosal Immunol.* mai 2012;5(3):267-276.
270. Varshney P, Jones SM, Scurlock AM, Perry TT, Kemper A, Steele P, et al. A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol.* mars 2011;127(3):654-660.
271. Flinterman AE, Pasmans SGMA, den Hartog Jager CF, Hoekstra MO, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Knol EF, et al. T cell responses to major peanut allergens in children with and without peanut allergy. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* avr 2010;40(4):590-597.
272. Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest.* avr 2003;111(7):1065-1072.
273. Sturm EM, Kranzelbinder B, Heinemann A, Groselj-Strele A, Aberer W, Sturm GJ. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry B Clin Cytom.* sept 2010;78(5):308-318.
274. Tammaro A, Narcisi A, Amodeo R, Portaro L, Tabacco F, Cardelli P, et al. CD63 cell expression detected by flow-cytometric determination of basophil activation in allergic patients. *Int J Immunopathol Pharmacol.* déc 2012;25(4):1143-1147.
275. González-Muñoz M, Villota J, Moneo I. Analysis of basophil activation by flow cytometry in pediatric house dust mite allergy. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol.* juin 2008;19(4):342-347.
276. Sensi LG, Piacentini GL, Nobile E, Ghebregzabher M, Brunori R, Zanolla L, et al. Changes in nasal specific IgE to mites after periods of allergen exposure-avoidance: a

- comparison with serum levels. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* avr 1994;24(4):377-382.
277. Marcucci F, Sensi LG, Migali E, Coniglio G. Eosinophil cationic protein and specific IgE in serum and nasal mucosa of patients with grass-pollen-allergic rhinitis and asthma. *Allergy.* mars 2001;56(3):231-236.
 278. Rondón C, Romero JJ, López S, Antúnez C, Martín-Casañez E, Torres MJ, et al. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2007;119(4):899-905.
 279. Rondón C, Doña I, López S, Campo P, Romero JJ, Torres MJ, et al. Seasonal idiopathic rhinitis with local inflammatory response and specific IgE in absence of systemic response. *Allergy.* oct 2008;63(10):1352-1358.
 280. Savilahti EM, Savilahti E. Development of natural tolerance and induced desensitization in cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol.* mars 2013;24(2):114-121.
 281. Savilahti EM, Rantanen V, Lin JS, Karinen S, Saarinen KM, Goldis M, et al. Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2010;125(6):1315-1321.e9.
 282. Savilahti EM, Saarinen KM, Savilahti E. Duration of clinical reactivity in cow's milk allergy is associated with levels of specific immunoglobulin G4 and immunoglobulin A antibodies to beta-lactoglobulin. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* févr 2010;40(2):251-256.
 283. Ebner C, Siemann U, Bohle B, Willheim M, Wiedermann U, Schenk S, et al. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* sept 1997;27(9):1007-1015.
 284. Benjaponpitak S, Oro A, Maguire P, Marinkovich V, DeKruyff RH, Umetsu DT. The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* mars 1999;103(3 Pt 1):468-475.
 285. Durham SR, Varney V, Gaga M, Frew AJ, Jacobson M, Kay AB. Immunotherapy and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* janv 1991;21 Suppl 1:206-210.
 286. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2007;120(3):707-713.
 287. Sabatos-Peyton CA, Verhagen J, Wraith DC. Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases. *Curr Opin Immunol.* oct 2010;22(5):609-615.

288. Möller C, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Høst A, Jacobsen L, et al. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J Allergy Clin Immunol.* févr 2002;109(2):251-256.
289. Bluestone JA, Auchincloss H, Nepom GT, Rotrosen D, St Clair EW, Turka LA. The Immune Tolerance Network at 10 years: tolerance research at the bedside. *Nat Rev Immunol.* nov 2010;10(11):797-803.
290. Luo X, Herold KC, Miller SD. Immunotherapy of Type 1 Diabetes – Where are We At and Where Should We Be Going. *Immunity.* 23 avr 2010;32(4):488-499.
291. Sabatos-Peyton CA, Verhagen J, Wraith DC. Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases. *Curr Opin Immunol.* oct 2010;22(5):609-615.
292. Von Herrath M, Peakman M, Roep B. Progress in immune-based therapies for Type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2013;n/a-n/a.
293. Diabetes Prevention Trial--Type 1 Diabetes Study Group. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 30 mai 2002;346(22):1685-1691.
294. Näntö-Salonen K, Kupila A, Simell S, Siljander H, Salonsaari T, Hekkala A, et al. Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 15 nov 2008;372(9651):1746-1755.
295. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, et al. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care.* mai 2005;28(5):1068-1076.
296. Gabryšová L, Wraith DC. Antigenic strength controls the generation of antigen-specific IL-10-secreting T regulatory cells. *Eur J Immunol.* mai 2010;40(5):1386-1395.
297. Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM, O'Garra A. Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity.* 21 août 2009;31(2):209-219.
298. Jankovic D, Kugler DG, Sher A. IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunol.* mai 2010;3(3):239-246.
299. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* mars 2010;10(3):170-181.
300. Gonsette RE, Delmotte P, Demonty L. Failure of basic protein therapy for multiple sclerosis. *J Neurol.* 18 août 1977;216(1):27-31.
301. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Bajenaru O, Carra A, et al. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with

- clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 31 oct 2009;374(9700):1503-1511.
302. Warren KG, Catz I, Ferenczi LZ, Krantz MJ. Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in an HLA Class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment. *Eur J Neurol Off J Eur Fed Neurol Soc*. août 2006;13(8):887-895.
 303. Freedman MS, Bar-Or A, Oger J, Traboulsee A, Patry D, Young C, et al. A phase III study evaluating the efficacy and safety of MBP8298 in secondary progressive MS. *Neurology*. 18 oct 2011;77(16):1551-1560.
 304. Ludvigsson J, Krisky D, Casas R, Battelino T, Castaño L, Greening J, et al. GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2 févr 2012;366(5):433-442.
 305. Thrower SL, James L, Hall W, Green KM, Arif S, Allen JS, et al. Proinsulin peptide immunotherapy in type 1 diabetes: report of a first-in-man Phase I safety study. *Clin Exp Immunol*. févr 2009;155(2):156-165.
 306. Orban T, Farkas K, Jalahej H, Kis J, Treszl A, Falk B, et al. Autoantigen-specific regulatory T cells induced in patients with type 1 diabetes mellitus by insulin B-chain immunotherapy. *J Autoimmun*. juin 2010;34(4):408-415.
 307. Alleva DG, Maki RA, Putnam AL, Robinson JM, Kipnes MS, Dandona P, et al. Immunomodulation in type 1 diabetes by NBI-6024, an altered peptide ligand of the insulin B epitope. *Scand J Immunol*. janv 2006;63(1):59-69.
 308. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*. 24 nov 2001;358(9295):1749-1753.

Annexe 1 : 99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: Immune therapies of type 1 diabetes: new opportunities based on the hygiene hypothesis

L Chatenoud,^{*†} S You,^{*†} H Okada,^{*†} C Kuhn,^{*†} B Michaud,^{*†} and J-F Bach^{*†}

^{*}Université Paris Descarte, Paris, France

[†]INSERM, Unité 1013, Paris, France

Clin Exp Immunol. 2010 April; 160(1): 106–112.

doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04125.x

ABSTRACT

Insulin-dependent (type 1) diabetes is a prototypic organ-specific autoimmune disease resulting from the selective destruction of insulin-secreting β cells within pancreatic islets of Langerhans by an immune-mediated inflammation involving autoreactive CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes which infiltrate pancreatic islets. Current treatment is substitutive, i.e. chronic use of exogenous insulin which, in spite of significant advances, is still associated with major constraints (multiple daily injections, risks of hypoglycaemia) and lack of effectiveness over the long term in preventing severe degenerative complications. Finding a cure for autoimmune diabetes by establishing effective immune-based therapies is a real medical health challenge, as the disease incidence increases steadily in industrialized countries. As the disease affects mainly children and young adults, any candidate immune therapy must therefore be safe and avoid a sustained depression of immune responses with the attendant problems of recurrent infection and drug toxicity. Thus, inducing or restoring immune tolerance to target autoantigens, controlling the pathogenic response while preserving the host reactivity to exogenous/unrelated antigens, appears to be the ideal approach. Our objective is to review the major progress accomplished over the last 20 years towards that aim. In addition, we would like to present another interesting possibility to access new preventive strategies based on the 'hygiene hypothesis', which proposes a causal link between the increasing incidence of autoimmune diseases, including diabetes, and the decrease of the infectious burden. The underlying rationale is to identify microbial-derived compounds mediating the protective activity of infections which could be developed therapeutically.

Keywords: anti-CD3, autoimmunity, hygiene hypothesis, tolerance induction, type 1 diabetes

INTRODUCTION

Identifying insulin-dependent or type 1 diabetes (T1D) as a polygenic autoimmune inflammatory disease is a relatively recent finding which occurred by the end of the 1970s. The academic diabetes community reacted rapidly to this important discovery, concentrating efforts to approach, first, the major issue of the early diagnosis of the immunological disease and secondly, to devise immune-based therapeutic strategies to delay and/or prevent disease progression. Compared to other autoimmune diseases, approaching the pathophysiology of T1D was problematic because of the difficulties in having direct access to the target organ in patients. However, on the positive side, spontaneous experimental models of the disease became available: the bio-breeding (BB) rat and the non-obese diabetic (NOD) mouse which, despite their obvious limitations, helped significantly to dissect the various stages of disease progression [1]. It appeared clearly from these models that the abnormal metabolic control, as assessed by hyperglycaemia and glycosuria, the hallmarks of T1D clinical diagnosis, was preceded by a long phase defined as ‘prediabetes’ during which the β cell autoantigen-specific inflammatory response developed silently, yet progressively. Thus, in NOD mice progressive infiltration of the islets of Langerhans by mononuclear cells, also termed insulitis, evolves in two distinct phases [1]. Insulitis appears by 3–4 weeks of age and up to 8–10 weeks is confined to the periphery of the islets (peri-insulitis) without any sign of active destruction of insulin-secreting β cells. As disease progresses, by 10–14 weeks of age the infiltrating cells invade the islets quite abruptly, i.e. aggressive insulitis, and rapid β cell destruction occurs causing overt hyperglycaemia.

The orchestrated mechanisms leading to β cell destruction all represent potential targets for therapeutic intervention. These mechanisms involve a central triad constituted by β cells, autoantigen-presenting cells and T lymphocytes. Autoantigen-presenting cells are heterogeneous and include dendritic cells (DCs), macrophages and B lymphocytes. The

observation that B cell-deficient NOD mice are disease free indicates that disease development is B cell-dependent [2]. In addition to their antigen-presenting role, macrophages and DCs are also key inflammatory effector cells. T lymphocytes involved in T1D are functionally heterogeneous, comprising pathogenic T cells and specialized subsets of regulatory T cells. β cell destruction involves pathogenic T cells, as demonstrated by the capacity of ‘diabetogenic’ CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes from the spleen of diabetic NOD mice to transfer disease into syngeneic immune-compromised recipients [NOD neonates, irradiated adult NOD mice, NOD severe combined immunodeficiency (SCID) mice][3]. In parallel, there is evidence to show that disease progression is controlled by T cell-mediated immune regulatory circuits involving distinct subsets of regulatory T cells [4,5]. It is also important to stress that β cells must not be viewed simply as ‘passive’ targets that are killed immediately by the immune-mediated insult. In a first step they ‘suffer’ from the inflammatory environment created by the insulinitis that, in a partially reversible fashion, inhibits their capacity to secrete insulin but also provides all the premises for establishing ‘cross-talk’ between the β cell and the immune cells and cytokines from the environment [6]. It is only in a second step that the β cell is eventually destroyed through apoptosis.

THE HYGIENE HYPOTHESIS AND AUTOIMMUNE DIABETES

During recent years the epidemiology of T1D has become alarming. The European continent is among the most affected parts of the world, with four of the five countries showing the highest figures, namely Finland, Sweden, Norway, the United Kingdom and Canada [7]. In addition, the disease is affecting younger children; two recent reports from a Finnish and a European cohort fully support these preoccupying conclusions [8,9].

This trend is not only valid for autoimmune diabetes. In fact, over the past three decades, in industrialized countries the prevalence of allergic and autoimmune diseases has increased tremendously [10]. Over the same period of time there has been an obvious decrease in these

countries of the incidence of many infections due to the improvement of hygiene standards and of medical care (use of antibiotics, vaccination campaigns and better socio-economic conditions). In northern European countries, in particular, rheumatic fever and hepatitis A are good examples to illustrate this tendency. Intestinal infections are another interesting example; their frequency has decreased significantly in developed countries, especially in young children, and it has been proved that there are major quantitative and qualitative differences in the intestinal flora in developed countries versus less-developed environments; i.e. colonization with Gram-negative bacteria occurs later. Major parasitic infections such as plasmodia or schistosoma are mostly non-existent in developed countries, and even infestation with minor parasites such as *Enterobius vermicularis* (pinworms) has decreased significantly over the last 10–20 years [11].

The working hypothesis proposing a causal link between the increasing incidence of allergic diseases and the decrease of infections was referred to as the ‘hygiene hypothesis’, coined by Strachan in 1989 [12], and has been extended to autoimmune diseases [10]. As formulated in its original inception, the hypothesis predicts that increased hygienic living conditions, the use of antibiotics and sterile food preparation will result in the continued segregation of the immune system from positive microbial exposure, thus favouring an increased susceptibility to immune-mediated disorders.

The best direct evidence in support of the hygiene hypothesis has been collected from experimental animal models. In susceptible strains of mice or rats, spontaneous autoimmune diseases develop faster and with a higher incidence in animals bred in a specific pathogen-free environment compared to those bred in conventional facilities. This is true in NOD mice and in BB rats and in rats with collagen or adjuvant-induced arthritis [10]. Disease is prevented in NOD mice by infecting the young mice with bacteria, viruses or parasites (i.e. mycobacteria, lymphocytic choriomeningitis virus, murine hepatitis virus, lactate dehydrogenase virus,

schistosoma, filariae) [10]. Similarly, infection of lupus-prone New Zealand black (NZB) mice or NZB–New Zealand white (NZB–NZW) F1 hybrid mice with lactate dehydrogenase virus or *Plasmodium berghei* prevents disease very effectively [10].

As a whole, based on epidemiological and experimental data there is now widespread recognition of the effect of infections on susceptibility to both allergic and autoimmune diseases. Such protective effect of infectious agents against immune-mediated diseases has clear public health and clinical implications: if one could characterize efficiently the microbial compounds that are responsible for the protective activity, these could be used therapeutically to prevent autoimmune and allergic diseases. There are, however, two major but not mutually exclusive problems: first, better characterization of the key microbial compounds and secondly, fine dissection of the cellular and molecular mechanisms mediating the protection.

LESSONS FROM IMMUNE INTERVENTION TRIALS IN RECENTLY DIAGNOSED AUTOIMMUNE DIABETES: FROM IMMUNOSUPPRESSION TO OPERATIONAL TOLERANCE

The identification of T1D as an immune-mediated disease led rapidly to immune intervention approaches. As a high priority, the academic diabetes community considered conducting well-designed innovative randomized trials, mainly placebo-controlled, the rationale of which was the direct continuation of preclinical data derived from animal studies. The balance today is that major proofs of concept emerged from three major immune intervention approaches.

A first approach, begun in the mid-1980s, was that of generalized immunosuppression trials, the most extensive ones using cyclosporin [13,14]. Results demonstrated for the first time that a T cell-directed immune intervention could reverse established hyperglycaemia, challenging the prevailing dogma at that time that too many β cells have been destroyed at this stage of the disease to allow any chance for metabolic reconstitution. Both experimental and clinical data have accumulated since, indicating that at diabetes onset a good proportion of potentially

functional β cells are still present, although they are impaired severely in their insulin-secreting capacity due to the effect of the immune-mediated inflammation. This explains the temporary improvement seen after beginning insulin treatment, and provides a rationale for the use of therapies that remove or inhibit aggressive islet-infiltrating cells. In spite of the significant rate of disease remission observed in cyclosporin-treated patients, disease relapse was observed invariably upon drug withdrawal, implying that indefinite administration would be necessary, which was unrealistic for safety reasons (i.e. nephrotoxicity and overimmunosuppression).

More recently, the use of a depleting CD20 monoclonal antibody (rituximab) was extended from other organ-specific autoimmune diseases such as multiple sclerosis [15] to T1D [16]. The reasoning was based on the evidence that B lymphocytes play a key role not only in autoantibody production but also in autoantigen presentation. In addition, encouraging data were reported in experimental models [17,18]. Results showed an improvement in stimulated C-peptide values shortly after the course of rituximab; values then declined progressively. The problem is to balance this efficacy with the massive B lymphocyte depletion induced by the treatment. Peripheral B cell counts ranged between approximately 10% and 69% of baseline levels at 6 and 12 months, respectively.

The second strategy, developed mainly over the past decade, consisted of more ambitious forms of immune therapy not aiming at immunosuppression but at inducing/restoring self-tolerance to well-defined β cell antigens. The rationale was based on the well-established notion that antigen delivery depends upon the molecular form of the antigen and its route of inoculation, and may lead either to effective immunization or to immune tolerance. This concept stemmed from pioneering experiments performed by D. W. Dresser in the early 1960s, showing that heterologous immunoglobulins that are immunogenic if administered in aggregated form induce specific unresponsiveness/immune tolerance, or 'immune paralysis',

if injected intravenously (i.v.) in non-aggregated form [19]. Thus it made sense to use well-defined autoantigens as therapeutic tools to attempt inducing/restoring self-tolerance in T1D. As in many other autoimmune diseases, in T1D various candidate autoantigens have been incriminated as potential triggers and targets of the disease. These include the main β cell hormone proinsulin/insulin itself, glutamic acid decarboxylase (GAD), a β cell-specific protein phosphatase IA-2, a peptide (p277) of heat shock protein 60 (hsp60), the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP), a preferential target of pathogenic CD8⁺ T cells, and the most recently characterized zinc transporter ZnT8. Targeting some of these antigens has proved successful in NOD mice, as disease was effectively prevented by administration of protein or specific peptide antigens such as pro-insulin, insulin, GAD, the p277 peptide of hsp60 using various routes [i.v., subcutaneous (s.c.), oral, intrathymic, intranasal][20].

Although highly effective in the experimental setting, the transfer to the clinic of β cell autoantigen-induced strategies was beset by a number of difficulties. Antigens used in patients included insulin or altered insulin peptides, GAD65 and the hsp60 p277 peptide (DiaPep277). Most applications have been via administration of the antigen or peptide alone, and one approach has included the administration of antigen plus adjuvant. Insulin has been the main antigen used clinically. It was readily available for clinical use; experiments in animal models consistently showed effects in preventing diabetes; and several evidences suggested that insulin could be a primary autoantigen in T1D. Insulin has been used as an immunotherapy via s.c., i.v., oral and intranasal routes. Two trials performed after diabetes onset in approximately 100 patients have tested the use of oral insulin at a limited dose range without observing efficacy [21,22]. In addition to these, a Phase I/II and subsequently a larger Phase II efficacy clinical trial were performed in recently diagnosed patients using NBI-6024, an altered peptide ligand (APL) of the 9–23 insulin B chain peptide. The data were reported

recently, describing no effect [23]. In 2001 a randomized, double-blind, Phase II study tested the therapeutic potential of DiaPep277 [24]. Initial results appeared encouraging, but were not confirmed in subsequent studies.

Antigen treatment alone has also been tested in prediabetes. The Diabetes Prevention Trial (DPT)-1 study studied the ability of i.v. plus s.c. insulin or oral insulin therapy to prevent or delay diabetes onset in insulin autoantibody-positive individuals with relatively late preclinical diabetes [25]. No delay of diabetes was observed in the i.v. plus s.c. trial. The same was true for the oral insulin trial although, in a hypothesis-generating analysis of a subgroup presenting high levels of anti-insulin autoantibodies ($> \text{ or } = 80 \text{ nU/ml}$), some suggestion of benefit was reported. A new trial is ongoing to test the hypothesis. Intranasal insulin has also been used as an immunotherapy to prevent T1D in islet autoantibody-positive children and adults: recently a large study in Finland reported no effect in delaying diabetes onset using daily intranasal administration of insulin at a single dose [26]. Another trial using the same strategy is ongoing in Australia. Finally, an ongoing trial (Pre-POINT) is testing oral and intranasal insulin vaccination as a primary therapy in islet autoantibody-negative children, and more recently the effect of antigen plus adjuvant (GAD-alum) in established T1D [27]. Although the primary end-point was not met (no significant effect on change in fasting C-peptide level after 15 months), fasting and stimulated C-peptide levels declined from baseline significantly less over time in the GAD-alum group than in the placebo group.

A third approach is based on experimental results obtained in the 1990s, showing that short-term CD3 antibody treatment (5 consecutive days) in recently diagnosed diabetic NOD mice induces permanent remission of the disease by restoring self-tolerance [28,29]; therapeutic trials were launched. The European multi-national multi-centre Phase II placebo-controlled clinical trial used the humanized Fc-mutated, aglycosylated ChAglyCD3 antibody [30]. A total of 80 patients presenting with new-onset T1D receiving insulin treatment for not more

than 4 weeks were randomized to receive a short 6-day treatment with 8 mg of ChAglyCD3 (40 patients) or placebo (40 patients). In this trial only adult patients were included. As already reported, the antibody preserved β cell function very efficiently, maintaining significantly higher levels of endogenous insulin secretion compared to placebo-treated patients at 6, 12 and even 18 months after treatment. This effect translated into a very significant decrease in the patients' insulin needs during the same study period. The study has been extended and the data from the 4-year follow-up showed a remarkably sustained effect [30].

At variance with conventional therapies, CD3 antibodies provided the proof of concept that it was possible to obtain a long-term therapeutic effect following a single short-course administration of a therapeutic agent that induced immune regulation.

CAN ONE DERIVE NEW TREATMENTS FOR PREVENTION OF AUTOIMMUNE DIABETES FROM THE HYGIENE HYPOTHESIS?

The clinical experience just reviewed outlines the difficulties of treating patients with established T1D. The preventive effect of infections on the progression of β cell aggression, which represents the basis of the hygiene hypothesis, applies to the early phases of the natural history of the disease [31]. It is thus logical to postulate that intervention aimed at 'reprogramming' the β cell-specific autoimmune response, as did infections in the past, might represent a simple and robust way to prevent T1D, inasmuch as the treatment proposed is totally safe (because by definition it will concern very young and still 'healthy' subjects). The search for such treatments is strictly dependent upon a better understanding of the immune mechanisms underlying the hygiene hypothesis.

HOW CAN INFECTIONS PROTECT FROM ALLERGY AND AUTOIMMUNE DISEASES?

Subsets of helper CD4⁺ T lymphocytes could be identified on the basis of the array of cytokines they produced. T helper type 1 (Th1) CD4⁺ T cells produce preferentially interleukin (IL)-2 and interferon (IFN)- γ that essentially support T cell growth, macrophage activation and cell-mediated immunity. Th2 cells produce IL-4, IL-6, IL-10 and IL-13, which contribute to antibody production. More recently described Th17 cells are a major source of IL-17 and IL-21. The development of most autoimmune diseases involves cell co-operation processes with Th1 and Th17 CD4⁺ cells, whereas the development of allergic diseases requires IL-4 and IL-5 produced by Th2 cells.

Based on initial reports pointing to the reciprocal down-regulation of Th1 and Th2 cells, some authors have suggested that in developed countries the lack of microbial burden in early childhood, which normally favours strong Th1-biased immunity, redirects the immune response towards a Th2 phenotype and therefore predisposes the host to allergic disorders. The problem with such an explanation was, however, that Th1 responses in the case of autoimmunity are not protective but pathogenic. These observations would fit with the concept of a common mechanism underlying infection-mediated protection against autoimmunity and allergy. Specialized subsets of T lymphocytes defined generally as regulatory T cells will be suitable candidates, as there is compelling data to show that they are highly effective in controlling both Th1- and Th2-mediated responses.

A second mechanism with relevance to the influence of infection on allergy and autoimmunity is antigenic competition, in which the immune response to an antigen is decreased by a concomitant immune response against an unrelated antigen. The competition is maximal when the unrelated antigen is administered a few days after the administration of the first antigen. Antigenic competition can affect antibody production [including immunoglobulin (Ig)E] and cell-mediated immune responses, as well as autoimmune and

allergic responses. The precise molecular basis of antigenic competition remains unknown, despite numerous investigations.

Another mechanism by which bacteria, parasites and viruses could protect against immune disorders is via stimulation of Toll-like receptors (TLRs) that bind pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). TLRs represent the early molecular sensors of invading microorganisms and link innate with adaptive immune responses [32]. To date, 10 members of the TLR family have been identified in humans and 13 in mice, and a series of genetic studies have unveiled their respective ligands. Mammalian TLRs can be expressed either on the cell surface (i.e. TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 and TLR-6) or intracellularly (TLR-3, TLR-7, TLR-8 and TLR-9). The recognition of microbial ligands by TLRs results in the induction of inflammatory cytokines, type I IFNs and chemokines. Moreover, signalling from TLRs induces the up-regulation of co-stimulatory molecules on specialized antigen-presenting cells such as DCs, thus increasing their antigen-presenting capacity. This process, referred to as DC maturation, in turn primes naive T lymphocytes towards specialized functionally distinct T lymphocyte subsets, such as Th1, Th2, Th17 and regulatory T lymphocytes.

Although TLRs were considered initially as the crucial stimulatory receptors capable of activating early defence mechanisms against invading pathogens, emerging data suggest that their role is far more complex and articulated. Thus, some TLR agonists are effective at prevention of T1D in NOD mice [33–37]. It is worth stressing at this point that there is also published evidence showing that stimulation of some TLRs may also trigger autoimmunity (well in keeping with the autoimmunity-promoting ability of some infections) [38–44]. Thus, both the nature of TLRs and the specific mechanisms involved in the immunoregulatory pathways they mediate must be dissected carefully before their clinical use as disease prevention tools can be envisioned.

THERAPEUTIC PERSPECTIVES

Based on these epidemiological and experimental data, and opting for a systematic approach, we decided to test whether bacterial extracts which were on the market for the treatment of respiratory infections could reproduce the well-described protective effect of infections on the development of diabetes in NOD mice [45]. The product used initially was OM-85 (Broncho-Vaxom; OM Pharma, Meyrin/Geneva, Switzerland), a bacterial extract prepared from eight bacterial species frequently responsible for respiratory tract infections. OM-85 is of particular pertinence because it has been used extensively and safely in children suffering from repeated upper respiratory tract infections.

In NOD mice OM-85 effectively prevented T1D onset when administered intraperitoneally (i.p.) and orally at dosages compatible with clinical use. The effect is optimal (complete prevention) when the treatment is started early (at 3 or 6 weeks of age), but some protection is still achieved when the treatment is started at 10 weeks of age. We examined the role of Th2 cytokines, namely IL-4 and IL-10, in the protective effect of OM-85. Using genetically deficient mice and cytokine-neutralizing monoclonal antibodies, we have demonstrated that the therapeutic effect does not involve the Th2 cytokine IL-4 but is tightly dependent upon transforming growth factor (TGF)- β . Natural killer (NK) T cells also participate in the therapeutic effect, as CD1d^{-/-} NOD mice are partially resistant to the protective effect of OM-85 [45].

Importantly, key mechanistic results were that OM-85 induced the production of IL-12 by DCs and of IL-10 essentially by B lymphocytes. It is important to stress at this point that there appears to be a tight dependency between the TGF- β -producing ability of OM-85 and the protective effect on the disease, because when a neutralizing anti-TGF- β antibody was administered immediately after OM-85, the protective effect of the drug was lost [45].

The second important finding was that, in spite of the fact that OM-85 is a mixture of several bacterial products, its protective effect on diabetes development appears to be mediated by

components targeting TLR-4 [45]. Supporting this conclusion further are the recent data we obtained using in vivo instead of the intact bacterial extract: well-defined TLR-4 ligands OM-174-DP and OM-197-MP-AC that are currently under clinical development as adjuvants [46–50]. These are mimics of the lipid A portion of lipopolysaccharide (LPS), possessing many of the biological activities of LPS but devoid of its toxic effects [46,48,50]. OM-174-DP and OM-197-MP-AC protected NOD mice significantly from the development of diabetes, similarly to OM-85. As with OM-85 the therapeutic activity correlated with an effect on B lymphocytes, leading to their proliferation and IL-10 secretion.

The immunopharmacology of TLR ligands is just at its beginning, but the results appear encouraging enough to invest in this novel immune intervention avenue.

DISCLOSURE

None of the authors has conflicts of interest to declare, or any relevant financial interest, in any company or institution that might benefit from this publication.

REFERENCES

1. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrine Rev.* 1994;15:516–42.
2. Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, et al. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell- mediated autoimmune diabetes: analysis of a new ‘speed congenic’ stock of NOD.Ig mu(null) mice. *J Exp Med.* 1996;184:2049–53.
3. Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes.* 1986;35:855–60.
4. Boitard C, Yasunami R, Dardenne M, et al. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med.* 1989;169:1669–80.
5. You S, Thieblemont N, Alyanakian MA, et al. Transforming growth factor-beta and T-cell-mediated immunoregulation in the control of autoimmune diabetes. *Immunol Rev.* 2006;212:185–202.
6. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5:219–26.
7. Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence – what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes.* 2007;8(Suppl. 6):6–14.
8. Harjutsalo V, Sjoberg L, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet.* 2008;371:1777–82.
9. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, et al. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. *Lancet.* 2009;373:2027–33.
10. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2002;347:911–20.
11. Gale EA. Can we change the course of beta-cell destruction in type 1 diabetes? *N Engl J Med.* 2002;346:1740–2.
12. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989;299:1259–60.
13. Stiller CR, Dupre J, Gent M, et al. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science.* 1984;223:1362–7.
14. Feutren G, Papoz L, Assan R, et al. Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial. *Lancet.* 1986;2:119–24.
15. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2008;358:676–88.
16. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med.* 2009;361:2143–52.

17. Hu CY, Rodriguez-Pinto D, Du W, et al. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest*. 2007;117:3857–67.
18. Xiu Y, Wong CP, Bouaziz JD, et al. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *J Immunol*. 2008;180:2863–75.
19. Dresser DW. Specific inhibition of antibody production. II. Paralysis induced in adult mice by small quantities of protein antigen. *Immunology*. 1962;5:378–88.
20. Bach JF, Chatenoud L. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:131–61.
21. Chaillous L, Lefevre H, Thivolet C, et al. Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial. Diabete Insuline Orale group. *Lancet*. 2000;356:545–9.
22. Pozzilli P, Pitocco D, Visalli N, et al. No effect of oral insulin on residual beta-cell function in recent-onset type I diabetes (the IMDIAB VII). IMDIAB Group. *Diabetologia*. 2000;43:1000–4.
23. Walter M, Philotheou A, Bonnici F, et al. No effect of the altered-peptide ligand NBI-6024 on beta cell residual function and insulin needs in new-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32:2036–40.
24. Raz I, Elias D, Avron A, et al. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*. 2001;358:1749–53.
25. The Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2002;346:1685–91.
26. Nanto-Salonen K, Kupila A, Simell S, et al. Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2008;372:1746–55.
27. Ludvigsson J, Faresjo M, Hjorth M, et al. GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;359:1909–20.
28. Chatenoud L, Thervet E, Primo J, et al. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:123–7.
29. Chatenoud L, Primo J, Bach JF. CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol*. 1997;158:2947–54.
30. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005;352:2598–608.
31. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach J-F. The ‘hygiene hypothesis’ for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*. 2010;160:1–9.
32. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:353–64.

33. Serreze DV, Hamaguchi K, Leiter EH. Immunostimulation circumvents diabetes in NOD/Lt mice. *J Autoimmun.* 1989;2:759–76.
34. Quintana FJ, Rotem A, Carmi P, et al. Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity. *J Immunol.* 2000;165:6148–55.
35. Sai P, Rivereau AS. Prevention of diabetes in the nonobese diabetic mouse by oral immunological treatments. Comparative efficiency of human insulin and two bacterial antigens, lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae*. *Diabetes Metab.* 1996;22:341–8.
36. Iguchi M, Inagawa H, Nishizawa T, et al. Homeostasis as regulated by activated macrophage. V. Suppression of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by LPSw (a lipopolysaccharide from wheat flour) *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992;40:1004–6.
37. Tian J, Zekzer D, Hanssen L, et al. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2001;167:1081–9.
38. Moriyama H, Wen L, Abiru N, et al. Induction and acceleration of insulinitis/diabetes in mice with a viral mimic (polyinosinic-polycytidylic acid) and an insulin self-peptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:5539–44.
39. Segal BM, Chang JT, Shevach EM. CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. *J Immunol.* 2000;164:5683–8.
40. Hansen BS, Hussain RZ, Lovett-Racke AE, et al. Multiple toll-like receptor agonists act as potent adjuvants in the induction of autoimmunity. *J Neuroimmunol.* 2006;172:94–103.
41. Lang KS, Recher M, Junt T, et al. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med.* 2005;11:138–45.
42. Lau CM, Broughton C, Tabor AS, et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med.* 2005;202:1171–7.
43. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature.* 2002;416:603–7.
44. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005;202:1131–9.
45. Alyanakian MA, Grela F, Aumeunier A, et al. Transforming growth factor-beta and natural killer T-cells are involved in the protective effect of a bacterial extract on type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006;55:179–85.
46. Brandenburg K, Lindner B, Schromm A, et al. Physicochemical characteristics of triacyl lipid A partial structure OM-174 in relation to biological activity. *Eur J Biochem.* 2000;267:3370–7.

47. Byl B, Libin M, Bauer J, et al. OM197-MP-AC induces the maturation of human dendritic cells and promotes a primary T cell response. *Int Immunopharmacol.* 2003;3:417–25.
48. Martin OR, Zhou W, Wu X, et al. Synthesis and immunobiological activity of an original series of acyclic lipid a mimics based on a pseudodipeptide backbone. *J Med Chem.* 2006;49:6000–14.
49. Pajak B, Garze V, Davies G, et al. The adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo. *Vaccine.* 2003;21:836–42.
50. Savoy F, Nicolle DM, Rivier D, et al. Synthetic triacylated lipid A derivative activates antigen presenting cells via the TLR4 pathway and promotes antigen-specific responses in vivo. *Immunobiology.* 2006;211:767–77.

Annexe 2 : Petit historique de l'allergologie

Le mot "allergie" est un terme inventé en 1906 par Le pédiatre viennois Clemens Von Pirquet (1874-1929). Ce terme est composé de deux noms grecs « αλλος » (*allos*) et εργον (*ergon*) ce qui désigne étymologiquement "Une autre façon de réagir".

De l'Antiquité au Moyen Age, les connaissances étaient subjectives

Déjà, au V^e siècle avant Jésus-Christ, Hippocrate décrivait l'asthme comme une difficulté de respirer en rapport avec un déséquilibre des humeurs provoquant une accumulation de phlegme dans les poumons. Il nomma eczéma un ensemble de maladies de la peau, dont la lèpre, et identifia l'allergie au fromage.

Par la suite, l'asthme a également été décrit par les médecins de la Rome antique et les praticiens arabes. Le médecin et philosophe juif Moïse Maïmonide (1138-1204) nous a laissé un traité de l'asthme avec, comme mesures thérapeutiques des mesures diététiques et d'hygiène.

Au Moyen Age, l'allergie était facilement associée à la sorcellerie : un patient allergique aux poils de chat pouvait en effet détecter la présence de l'animal dans une pièce sans le voir, ce qui paraissait diabolique.

De la renaissance au XVIII^e siècle, apparaissent les premières observations subjectives

Au XVI^e siècle, Léonardo Botallo (1519-1588) publie en 1564 une description du rhume des foins ou catarrhe estivale et la rapporte à l'inhalation du parfum de la rose ("De catarrho commentarius Addita est in fine monstrosorum renum figura, nuper in cadavere repertorum").

A la même époque, Gerolamo Cardano (dit Jérôme Cardan, 1501-1576) guérit John Hamilton, archevêque d'Edimbourg, de son asthme probablement allergique aux acariens, en lui prescrivant de changer de literie et de dormir sur un matelas en soie plutôt qu'en plumes.

En 1586, Marcello Donati décrit un cas typique d'allergie à l'œuf avec urticaire et œdème de Quincke.

Entre le XVII^e et le XVIII^e siècle, deux médecins décrivent l'influence de l'environnement sur les maladies allergiques. Bernardino Ramazzini (1633-1714), médecin italien, décrit l'asthme des boulangers et des meuniers dans son ouvrage « *De Morbis Artificum Diatriba* » paru à Modène en 1700 et se distingue comme le « père de la médecine du travail ». De son côté, Sir John Floyer (1649-1734), médecin anglais, décrit l'asthme d'effort et relève le rôle néfaste des fumées et du tabac dans son livre « *A treatise of the asthma* », publié en 1698. Il souligne également l'effet nocif de la poussière de maison.

Au XIX^e siècle est décrite la pollinose

En 1819, John Bostock (1773–1846) décrit le rhume des foins. Le médecin anglais Charles Harrison Blackley (1820-1900) découvre en 1859 le rôle des graminées. Blackley, qui était lui-même atteint de pollinose et peut être considéré comme le père de l'allergologie, recueille dans l'air, à l'aide d'un cerf-volant, des grains de pollen dans les différentes couches d'air, et les teste sur lui-même. Il réalise les premiers tests cutanés par scarifications et établit la relation de cause à effet entre la quantité de pollens présents dans l'air et la gravité de la pollinose. Ses résultats sont publiés en 1873 dans l'ouvrage « *Experimental researches on the causes and nature of Catarrhus Aestivus (hay-fever or hay-asthma)* ».

L'allergie naît réellement au XX^e siècle...

...avec la découverte par Charles Richet (1850-1935) et Paul Portier (1866-1962) de l'anaphylaxie. En 1901, sur le bateau du prince Albert de Monaco, ils réalisent sur le chien Neptune une première injection d'extrait de Physalie (méduse connue pour provoquer des réactions urticariennes chez les pêcheurs) afin de le protéger. Mais, lors d'une deuxième injection réalisée quelques jours plus tard, ils provoquent la mort de l'animal. La première injection n'avait donc pas protégé l'animal mais l'avait bien sensibilisé. Ils nomment ce phénomène « anaphylaxie », c'est-à-dire le contraire de la protection : *ana (ana)*, en sens contraire, et *φύλαξις (phulaxis)*, protection. Charles Richet obtient pour cette découverte fondamentale le prix Nobel en 1913.

En 1921, Otto Carl Prausnitz (1876-1963) et Heinz Küstner (1897-1963) réalisent leur expérimentation classique connue depuis lors comme le PK test ou test de transfert passif (1). Du sérum de Küstner, allergique au poisson cuit est injecté en petite quantité (0.05 à 0.1ml) au niveau du bras de Prausnitz qui lui n'est pas allergique au poisson. 24 heures après, Prausnitz est testé avec un extrait de poisson au même endroit (0.02ml). Pour la première fois de sa vie, il présente un test cutané positif au poisson: papule (oedème) et érythème (rougeur). Cet événement ne pouvait s'expliquer que par la présence dans le sérum de Küstner d'un facteur capable d'entraîner une réaction cutanée immédiate. Ce facteur fut baptisé plus tard « réagine », par référence aux rougeurs visibles sur la peau. De nombreuses années passèrent avant de savoir que la réagine était une Immunoglobuline E. Ces deux auteurs réalisèrent que ce facteur pourrait être une méthode de diagnostic spécifique pour identifier soit un antigène soit un anticorps.

En 1923, Arthur Fernandez Coca (1875-1959), un des premiers collaborateurs de Cooke décrit le concept d'atopie ou "maladie étrange", réaction bizarre inclassable, qui vient du grec: a (privatif) et *τοπος (topos)*, lieu). Cependant, Coca signalait que cette hypersensibilité n'était

pas transférable passivement et n'était pas analogue à l'anaphylaxie expérimentale chez l'animal.

En 1935, Robert Anderson Cooke (1880 -1960) et Mary Hewit Loveless (1899-1991) décrivent l'élévation du taux des "anticorps bloquants" (anticorps thermostables, résistant à la chaleur), à la suite d'injections d'extraits allergéniques. Ils ouvrent ainsi une nouvelle ère de recherches dans le mécanisme de la réponse allergique.

En 1965, le couple Teruko et Kimishige Ishizaka, aux USA, en travaillant sur les pollens d'ambrosies, isolent une fraction riche en réagines à partir du sérum d'un sujet très sensible à l'ambrosie. Cette fraction injectée à des lapins produit des anticorps. Après plusieurs mois, ils obtiennent un antisérum qui satisfait leurs demandes : mélangé au sérum du patient riche en réagines, l'activité de la réaction PK disparaît. Ainsi les Ishizaka avaient démontré que les réagines appartenaient à une classe inconnue d'immunoglobuline qu'ils appelèrent "globuline gamma E"(2).

A la même époque que les Ishizaka et indépendamment d'eux, Hans Bennich (né en 1930) et S.G.O. Johanson (né en 1938) en Suède, découvrent chez un patient atteint d'un myélome (cancer de la moelle), une protéine atypique en grande quantité, qu'ils appellent la protéine ND, des initiales du malade (3). Avec l'aide de L. Wide, ils montrent que cette Immunoglobuline ND est bien présente dans le sérum de sujets normaux mais en très faible quantité. Poursuivant leurs travaux, ils découvrent que des patients asthmatiques allergiques et/ou atteints de rhume des foins présentent des taux élevés de Immunoglobulines ND. Avec la collaboration de chercheurs britanniques, ils mettent en évidence que de petites quantités de Immunoglobulines ND bloquent la réaction de Prausnitz Küstner.

Les deux équipes concluent, après une étude approfondie de leurs résultats, qu'ils avaient travaillé sur la même immunoglobuline. La conférence de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) de Lausanne en 1968 officialisa la découverte d'une cinquième classe d'immunoglobuline sérique humaine sous le nom d' Immunoglobuline E.

La recherche en allergologie se développe tout au long du XX^e siècle pour aboutir notamment à la découverte du rôle de l'histamine dans l'allergie par Daniel Bovet en 1933 (prix Nobel en 1957). Bernard Halpem utilisa le premier anti-histaminique chez l'homme en 1942 (4).

Parallèlement, l'immunothérapie voit le jour et est initiée au St Mary's Hospital à Londres et les publications de Noon (1911) et de Freeman (1914) en montrent les premiers effets bénéfiques dans l'allergie à l'ambrosie (5,6). Le premier protocole d'immunothérapie sous-cutanée en rush est réalisé en 1930, aux pollens de graminées (7).

Les hypothèses cherchant à expliquer l'allergénicité de la poussière de maison furent nombreuses et ce n'est qu'en 1964 que R. Voorhorst fit avec Fthm Spieksma et Mia Spieksma-Boezeman, la découverte fondamentale que dans la poussière de maison les principaux producteurs d'allergènes étaient en fait les acariens sous nos climats (8) et le premier protocole d'immunothérapie sub-linguale eu lieu en 1986 et chez des patients allergiques aux acariens (9).

Depuis la fin des années 80, le développement des techniques de biologie moléculaire permet la purification des protéines allergéniques, la détermination de leur séquence, la fabrication d'anticorps monoclonaux chez la souris et l'application de la technique de l'ADN recombiné pour la production d'allergènes recombinants.

En 1988, l'allergène majeur des acariens Der p 1 est cloné (10) .

Références

1. Prausnitz C., Küstner H. Studies on supersensitivity. Centrbl Bakteriol. 160-169.
2. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook Mm. Blocking Of Prausnitz-Kuestner Sensitization With Reagin By Normal Human Beta-2a GLOBULIN. J Allergy. oct 1963;34:395-403.
3. Johansson SG, Bennich H. Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. Immunology. oct 1967;13(4):381-394.
4. Mnaker H. L’histoire de l’allergie: une aventure vieille de plus de 2500ans. J Faxé Allergol. 24 déc 2008;
5. Vaccination against hay-fever. J. Freeman. lancet., april 25, 1914. The Laryngoscope. 1914;24(9):791-791.
6. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. The Lancet. 10 juin 1911;177(4580):1572-1573.
7. Durham SR, Leung DYM. One hundred years of allergen immunotherapy: time to ring the changes. J Allergy Clin Immunol. janv 2011;127(1):3-7.
8. Voorhorst R, Spieksma-Boezeman Mi, Spieksma Ft. Is A Mite (Dermatophagoides Sp.) The Producer Of The House-Dust Allergen? Allerg Asthma (Leipz). 1964;10:329-334.
9. Scadding GK, Brostoff J. Low dose sublingual therapy in patients with allergic rhinitis due to house dust mite. Clin Allergy. sept 1986;16(5):483-491.
10. Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM, et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. J Exp Med. 1 janv 1988;167(1):175-182.

Bibliographie

L’histoire de l’allergie : une aventure vieille de plus de 2500 ans. H. Vinaker, Le journal faxé d’allergologie, 24 Décembre 2008

Survol historique de la connaissance des allergènes. G Pauli ; Allerdatab, 28 Août 2007

Les ancêtres de l’allergie, P Molckhou, 24 Janvier 2001, Copyright ABC Allergies

Résumé

Etude de la réponse lymphocytaire T dans l'allergie de l'enfant, au diagnostic et au cours de la désensibilisation.

Les maladies allergiques sont de plus en plus fréquentes. Elles atteignent souvent l'enfant jeune chez qui l'allergie respiratoire et l'allergie alimentaire sont les principales pathologies. L'unique traitement curatif est l'immunothérapie spécifique d'allergène (ITA), largement développée dans l'allergie respiratoire et encore à ses débuts dans l'allergie alimentaire. Pour adapter au mieux la prise en charge du patient, le diagnostic précis de l'allergie est indispensable et il n'existe actuellement pas d'examen biologique totalement fiable. Seule, la présence d'IgE spécifiques permet de diagnostiquer une sensibilisation à un allergène mais pas une allergie cliniquement symptomatique.

Dans une première partie, nous avons étudié l'intérêt d'un test fonctionnel, l'ELISpot (Enzyme-linked immunosorbent spot), dans le diagnostic de l'allergie aux acariens chez l'enfant asthmatique. Le nombre de lymphocytes T circulants spécifiques d'acariens sécrétant d'interleukine (IL)-4 ou d'IL-13 était associé à la présence d'une allergie symptomatique, indépendamment des IgE spécifiques. Il était plus élevé dans le cas d'une rhinite allergique sévère et plus faible dans le cas d'une rhinite allergique légère. De plus, il variait au cours de l'année en fonction des saisons avec un pic en automne et un pic en début de printemps.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'intérêt de l'ELISpot dans le diagnostic de l'allergie au lait de vache chez l'enfant, confirmée par un test de provocation orale en double aveugle. Nous avons décrit que le nombre de lymphocytes T spécifiques de la caséine et sécrétant d'IL-4 et d'IL-13 était associé à l'allergie au lait de vache avec une sensibilité proche de 100%. Par ailleurs, le nombre de lymphocytes T spécifiques de la caséine était également associé à la dose maximale de lait tolérée par l'enfant.

Enfin, dans une troisième partie, nous avons étudié la réponse lymphocytaire T au cours d'une ITA sub-linguale (SLIT) d'une part et sous-cutanée (SCIT) d'autre part, chez des enfants asthmatiques allergiques aux acariens suivis pendant une année. Nous avons décrit une diminution des lymphocytes Th2 (sécrétant d'IL-4 et IL-13) spécifiques d'acariens après 12 mois de SLIT associée à une augmentation des cellules sécrétrices d'IL-10 (Tr1) spécifiques d'acariens après 6 mois de SLIT. De plus, les lymphocytes T régulateurs (CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}Foxp3⁺) étaient augmentés après 12 mois de SCIT. Nous n'avons pas retrouvé de production accrue d'interféron γ (IFN γ) par les lymphocytes T spécifiques d'acariens au cours de la désensibilisation.

Au total, ce travail nous a permis de décrire que l'étude *ex vivo* des cellules T spécifiques d'allergène en utilisant l'ELISpot, permet de réaliser un diagnostic fiable de l'allergie aux acariens et de l'allergie au lait de vache chez l'enfant. Par ailleurs, l'ITA induit une diminution des cellules Th2 et une augmentation des cellules Tr1 spécifiques d'allergène par voie sub-linguale ainsi qu'une augmentation des Treg Foxp3⁺ par voie sous-cutanée sans immunodéviation Th2/Th1, chez l'enfant allergique aux acariens.

Mots clés : Allergie respiratoire, acariens, allergie alimentaire, cellules Th2, cellules T régulatrices (Treg), cellules Tr1, immunothérapie spécifique de l'allergène (ITA)